



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 118841

(13) C2

(51) МПК

C12N 15/82 (2006.01)

A01N 63/02 (2006.01)

A01H 5/10 (2018.01)

A01P 7/04 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2015 07615	(72) Винахідник(и):	Авніель Амір (IL), Лідор-Нілі Єфрат (IL), Маор Руді (IL), Меір Офір (IL), Нойвірт-Брік Орлі (IL)
(22) Дата подання заявки:	30.12.2013	(73) Власник(и):	Ей.Бі. СІДС ЛТД., 1 HaGolan Street, P.O. Box 1061, 7111001 Lod, Israel (IL)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	25.03.2019	(74) Представник:	Боровик Петро Антонович, реєстр. №166
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	61/908,855, 61/748,095, 61/748,094, 61/748,101, 61/748,099, 61/814,888, 61/814,892, 61/814,899, 61/814,890, 61/908,965	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	WO 2007/039454 A1, 12.04.2007 WO 2008/148223 A1, 11.12.2008 EP 1416049 A1, 06.05.2004 WO 2005/110068 A2, 24.11.2005 WO 2008/007100 A2, 17.01.2008 WO 2011/001434 A1, 06.01.2011 UNNAMALAI N et al. Cationic oligopeptide- mediated delivery of dsRNA for post- transcriptional gene silencing in plant cells. FEBS LETTERS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL. 21.05.2004, vol. 566, № 1-3, P. 307-310
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	26.11.2013, 01.01.2013, 01.01.2013, 01.01.2013, 01.01.2013, 23.04.2013, 23.04.2013, 23.04.2013, 23.04.2013, 26.11.2013		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	US, US, US, US, US, US, US, US, US, US		
(41) Публікація відомостей про заявку:	12.01.2016, Бюл.№ 1		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	25.03.2019, Бюл.№ 6		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/IL2013/051085, 30.12.2013		

(54) СПОСІБ ФОРМУВАННЯ РОСЛИНИ, ЯКА МАЄ ПІДВИЩЕНУ СТІЙКІСТЬ ДО КОМАХИ-ШКІДНИКА

UA 118841 C2

(57) Реферат:

Винахід стосується способу формування рослини, яка має підвищену стійкість до комах-шкідника, який включає праймінг насінини перед контактом насінини з молекулою голої дволанцюгової РНК (длРНК), який здійснюють шляхом промивання насінини перед вказаним контактуванням насінини і наступного сушіння насінини; контакт згаданої насінини напряду зі згаданою молекулою длРНК, яка включає щонайменше 18 суміжних нуклеотидів гена комах-шкідника або послідовність РНК, транскрибовану зі згаданого гена, контакт здійснюють шляхом замочування насінини у розчині, що містить остаточну концентрацію від 0,0005 мкг/мкл до 3 мкг/мкл згаданої молекули голої длРНК, та збовтування насінини у цьому розчині протягом від 4 до 24 годин, причому молекула голої длРНК вводиться у згадану насінину, проте не експресується з геному рослини, тобто не стає невід'ємним елементом геному; і пророщування насінини для отримання рослини, яка проявляє поліпшену стійкість до цієї комах-шкідника в порівнянні з контрольною рослиною.

IAP1-DS1

ОЦІНКА	ОЧІКУВАННЯ	ГЕПИ	ЛАНЦЮГ	ФРЕЙМ
ІДЕНТИЧНІСТЬ				

374	BTS(40)	0.910	22/23(96%)	0/23(0%)	плюс.плюс
-----	---------	-------	------------	----------	-----------

ОЗНАКИ:

QUERY	501	TCTCCCTATAGTGAGTCGTATTA	523
SBJCT	90683	TCGCCCTATAGTGAGTCGTATTA	90705

Fig.10C

Область техніки

Запропоновано способи та композиції для поліпшення стійкості насіння до комах-шкідників. Також запропоновані спосіб і композиції для поліпшення стійкості рослин до вірусних патогенів.

Передумови для створення винаходу

При зростаючій кількості населення світу і зростанні попиту на їжу, паливо і волокно, а також враховуючи зміни клімату, сільське господарство зазнає безпрецедентних труднощів. Вкрай бажаним є культивування рослин з поліпшеними характеристиками, причому деякі з основних характеристик, які становлять великий інтерес для фермерів і компаній, що виробляють насіння, включають підвищену толерантність до абіотичного стресу, ефективність використання добрив, стійкість до хвороб, врожайність і т.д.

Характеристики рослин зазвичай вдосконалюють або генно-інженерними методами, або традиційною селекцією. Вкрай бажаними є нові способи вдосконалення характеристик шляхом модифікації специфічних генів. Вони включають способи надекспресії генів або сайленсінгу генів. Хорошим способом сайленсінгу послідовність-специфічних генів є РНК-інтерференція (далі RNAi). Вперше відкрита в нематоді *C.elegans* (Файр та ін. (Fire et al.) 1998, *Nature*, 391: 806-811), RNAi є механізмом, в якому експресія окремого гена може бути специфічно пригнічена шляхом введення дволанцюгової РНК (далі dsРНК або dsRNA), яка гомологічна з обраним геном в клітинах. Усередині клітини молекули dsRNA розрізаються на більш короткі фрагменти з 21 - 27 нуклеотидів ферментом, що належить до зв'язуючого фермента рибонуклеази III (сімейство білків Dicer). Ці фрагменти, що зветься малими інтерферуючими РНК (далі miРНК або siRNA), включають в РНК-індукований сайленсінг-комплекс (далі РНК-індукований сайленсінг-комплекс або RISC). Після додаткової обробки siRNA трансформують у одноланцюгові РНК, які діють як провідні послідовності для розщеплення, в кінцевому результаті, месенджерних РНК-мішеней. Шляхом використання RNAi для специфічного сайленсінгу відповідних генів-мішеней, можна змінювати базові характеристики організму. У специфічному застосуванні до рослин це має неймовірний потенціал для модифікацій, які можуть призвести до підвищеної стійкості до стресу і підвищеної врожайності зернових.

RNAi в рослинах зазвичай виконують шляхом продукції трансгенних рослин, які надекспресують фрагмент ДНК, який транскрибують для отримання dsRNA. Цю dsRNA потім обробляють для отримання siRNA, які опосередковують відщеплення і сайленсінг генів-мішеней.

Основне технічне обмеження цієї технології полягає в тому, що багато важливих видів сільськогосподарських культур важко або неможливо трансформувати, що виключає конститутивну експресію конструктів, направляючих продукцію dsRNA. Більше того, питання, що стосуються потенційного впливу стійких до вірусів трансгенних рослин на екологію, досі значно обмежують їх використання (Тепфер (Tepfer), 2002, *Annu. Rev. Phytopathol.* 40, 467-491). Додаткова проблема в отриманні трансгенних рослин відноситься до проблеми забезпечення подій трансформації і регенерації в клітинах одних і тих же типів.

У зв'язку з цим, розробка способу отримання трансформованого насіння, який не залежить від способів, що відносяться до культивування тканин, є пріоритетним дослідженням в галузі молекулярної біології рослин.

Розкриття винаходу

Відповідно до одного аспекту деяких варіантів здійснення даного винаходу, запропонований спосіб введення голої dsRNA в насінину, причому спосіб включає контакт насінини з голою dsRNA в умовах, які дозволяють dsRNA проникати в насінину, тим самим вводячи dsRNA в насінину.

Відповідно до одного аспекту деяких варіантів здійснення даного винаходу, запропоновано ізольоване насіння, що включає екзогенну голу dsRNA, причому насіння позбавлене гетерологічного промотора для стимуляції експресії dsRNA в рослині.

Відповідно до одного аспекту деяких варіантів здійснення даного винаходу, запропоновано ізольовану насінину, що включає екзогенну голу dsRNA3.

Відповідно до одного аспекту деяких варіантів здійснення даного винаходу, запропоновано рослину або частину рослини, що включають екзогенну голу dsRNA та позбавлені гетерологічного промотора для стимуляції експресії dsRNA в рослині.

Відповідно до одного аспекту деяких варіантів здійснення даного винаходу, запропоновано пристрій для вміщення насінини, що включає деяку кількість такого насіння.

Відповідно до одного аспекту деяких варіантів здійснення даного винаходу, запропоновано засіяне поле, що включає деяку кількість такого насіння.

Відповідно до одного аспекту деяких варіантів здійснення даного винаходу, запропонований спосіб отримання рослини, причому спосіб включає:

(a) отримання насінини і

(b) пророщування насінини, щоб отримати рослину.

Відповідно до одного аспекту деяких варіантів здійснення даного винаходу, запропонований спосіб модуляції експресії генів, причому спосіб включає:

5 (a) контакт насінини рослини з голою dsRNA в умовах, які дозволяють dsRNA проникати в насінину, тим самим вводячи dsRNA в насінину, і, за вибором,

(b) отримання рослини з насінини.

Відповідно до деяких варіантів здійснення винаходу, гола dsRNA призначена для зниження експресії гена рослини.

10 Відповідно до деяких варіантів здійснення винаходу, гола dsRNA призначена для зниження експресії гена фітопатогена.

Відповідно до деяких варіантів здійснення винаходу, проникнення здійснюється в ендосперм і, альтернативно або додатково, в зародок насінини.

15 Відповідно до деяких варіантів здійснення винаходу, гола dsRNA не інтегрується в геном насіння.

Відповідно до деяких варіантів здійснення винаходу, умови призводять до присутності dsRNA в рослині протягом щонайменше 10 діб після проростання.

20 Відповідно до одного аспекту деяких варіантів здійснення даного винаходу, запропонований спосіб інгібування експресії гена-мішені в фітопатогенному організмі, причому спосіб включає вплив фітопатогенного організму на рослину або частину рослини, тим самим інгібуючи експресію гена-мішені в фітопатогенному організмі.

Відповідно до деяких варіантів здійснення винаходу, фітопатогенний організм вибирають з групи, що складається з гриба, нематоди і комах.

25 Відповідно до деяких варіантів здійснення винаходу, спосіб крім того включає спостереження смерті або інгібування росту фітопатогена після отримання.

Відповідно до одного аспекту деяких варіантів здійснення даного винаходу, запропонований набір для введення голої dsRNA в насіння, що включає:

(i) голу dsRNA і

(ii) праймінговий розчин.

30 Відповідно до деяких варіантів здійснення винаходу, гола dsRNA і розчини для праймінга (передпосівного замочування) містяться в роздільних контейнерах.

Відповідно до деяких варіантів здійснення винаходу, dsRNA включає siRNA.

Відповідно до деяких варіантів здійснення винаходу, dsRNA включає siRNA і dsRNA.

35 Відповідно до деяких варіантів здійснення винаходу, контакт здійснюють шляхом інокуляції dsRNA в насінину.

Відповідно до деяких варіантів здійснення винаходу, спосіб крім того включає праймінг насінини перед контактом.

Відповідно до деяких варіантів здійснення винаходу, праймінг здійснюють шляхом:

40 (i) промивки насінини перед контактом і

(ii) сушіння насінини після етапу (i).

Відповідно до деяких варіантів здійснення винаходу, промивку здійснюють у присутності двічі деіонізованої води.

Відповідно до деяких варіантів здійснення винаходу, промивку здійснюють протягом 2 – 6 годин.

45 Відповідно до деяких варіантів здійснення винаходу, промивку здійснюють при 4 - 28 °C.

Відповідно до деяких варіантів здійснення винаходу, сушіння здійснюють при 25 - 30 °C протягом 10 - 16 годин.

Відповідно до деяких варіантів здійснення винаходу, контакт здійснюють у присутності голої dsRNA в кінцевій концентрації 0,1 - 100 мкг/мкл.

50 Відповідно до деяких варіантів здійснення винаходу, контакт здійснюють у присутності голої dsRNA в кінцевій концентрації 0,1 - 0,5 мкг/мкл.

Відповідно до деяких варіантів здійснення винаходу, спосіб крім того включає обробку насінини агентом, який вибирається з групи, що складається з пестициду, фунгіциду, інсектициду, добрива, покриваючого засобу і фарбуючого засобу, після контакту.

55 Відповідно до деяких варіантів здійснення винаходу, обробка включає покриття насінини агентом.

Відповідно до деяких варіантів здійснення винаходу, насінини не містить агента, який вибирається з групи, що складається з пестициду, фунгіциду, інсектициду, добрива, покриваючого засобу і фарбуючого засобу.

60 Відповідно до деяких варіантів здійснення винаходу, dsRNA призначена для зниження

експресії кодуючого гена.

Відповідно до деяких варіантів здійснення винаходу, dsRNA призначена для зниження експресії некодуючого гена.

Відповідно до деяких варіантів здійснення винаходу, насінина належить до надродини 5 зелених рослин.

Відповідно до деяких варіантів здійснення винаходу, умови дозволяють dsRNA накопичуватися в ендоспермі і, альтернативно або додатково, в зародку насінини.

Відповідно до деяких варіантів здійснення винаходу, концентрацію голої dsRNA регулюють по параметру, який вибирається з групи, що складається з розміру насінини, маси насінини, 10 об'єму насінини, площі поверхні насінини, щільності насінини і проникності насінини.

Відповідно до деяких варіантів здійснення винаходу, контакт здійснюють перед порушенням стану спокою насінини і появою зародка.

Відповідно до деяких варіантів здійснення винаходу, насіниною є замочена в праймінговому розчині насінина.

Відповідно до деяких варіантів здійснення винаходу, насінина або рослина включає 15 активність РНК-залежної РНК-полімерази для ампліфікації експресії dsRNA.

Відповідно до деяких варіантів здійснення винаходу, насіниною є гібридна насінина.

Відповідно до деяких варіантів здійснення, запропонована ізольована dsRNA, що включає нуклеїно кислотну послідовність, що має:

20 (i) рівень гомології з геном рослини, достатній для індукування ампліфікації вторинних siRNA-продуктів dsRNA в клітині рослини, яка включає їх, причому зниження активності гена рослини dsRNA несуттєво впливає на біомасу, силу або врожайність рослини; і

(ii) рівень гомології з геном фітопатогенного організму, достатній для індукування деградації гена фітопатогенного організму, причому фітопатогенний організм залежить від вирощуваної 25 рослини, і причому деградація індукує припинення росту або смерть фітопатогенного організму.

Відповідно до деяких варіантів здійснення, нуклеїно кислотна послідовність має довжину щонайменше 25 пар основ. Відповідно до деяких варіантів здійснення, нуклеїно кислотна послідовність має довжину 25 -70 пар основ. Відповідно до деяких варіантів здійснення, dsRNA з такою нуклеїно кислотною послідовністю щонайменше на 80% ідентична гену рослини.

Відповідно до деяких варіантів здійснення, нуклеїно кислотна послідовність має довжину більше ніж 70 пар основ. Відповідно до деяких варіантів здійснення, нуклеїно кислотна послідовність 30 включає нуклеїно кислотний сегмент довжиною щонайменше 70 пар основ, який щонайменше на 65% ідентичний гену рослини, і/або другий нуклеїно кислотний сегмент довжиною щонайменше 17 пар основ, який щонайменше на 85% ідентичний гену рослини. Відповідно до

35 деяких варіантів здійснення, перший нуклеїно кислотний сегмент і другий нуклеїно кислотний сегмент перекриваються. Відповідно до деяких варіантів здійснення, перший нуклеїно кислотний сегмент і другий нуклеїно кислотний сегмент не мають області перекривання. Відповідно до деяких варіантів здійснення, ген рослини експресується в більшості органів рослини, починаючи з проростання. Відповідно до деяких варіантів здійснення винаходу, ізольована dsRNA 40 щонайменше на 80% гомологічна з геном фітопатогена.

Кілька варіантів здійснення відносяться до способу отримання рослини, що має підвищену стійкість до комах-шкідників, причому спосіб включає: вирощування рослини з насінини, причому насінина контактує з молекулою екзогенної dsRNA, що включає послідовність, яка по

45 суті ідентична або по суті комплементарна до щонайменше 18 суміжних нуклеотидів гена комах-шкідника або до послідовності РНК, транскрибованої зі згаданого гена, причому рослина має поліпшену стійкість до цього комах-шкідника в порівнянні з контрольною рослиною, причому контрольна рослина вирощена з насінини, не контактуючої з молекулою екзогенної dsRNA. У деяких варіантах здійснення рослиною є кукурудза, соя, рис, пшениця, томат, огірок, салат, бавовна або ріпак. У деяких варіантах здійснення комахою-шкідником є *Spodoptera*

50 *littoralis*, *Diabrotica virgifera virgifera* або *Leptinotarsa decemlineata*. У деяких варіантах здійснення ген комах-шкідника вибирають з групи, що складається з АТФази (аденозинтрифосфатази), NADPH (нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат•Н, далі НАДФ•Н або NADPH)- (цитохром P450)-

оксидоредуктази, IAP (інгібітора апоптозних білків, далі ІАБ або IAP), хітинсинтази, EF1α і β-актину. У деяких варіантах здійснення молекула екзогенної dsRNA включає послідовність, яка по суті є тотожна або по суті комплементарна до щонайменше 18 суміжних нуклеотидів послідовностей SEQ ID No: 21-26, 31, 34, 37, 38, 131-133, 144 або 145. У деяких варіантах здійснення молекула екзогенної dsRNA включає послідовність, яка по суті ідентична або по суті комплементарна до щонайменше 18 суміжних нуклеотидів послідовностей SEQ ID No: 146-190. У деяких варіантах здійснення молекула екзогенної dsRNA включає нуклеїно кислотну

60 послідовність, яка щонайменше на 80% ідентична ендемічному гену рослини щонайменше на

25 послідовних парах основ. У деяких варіантах здійснення насінину крім того обробляють агентом, що вибирається з групи, яка складається з пестициду, фунгіциду, інсектициду, добрива, покриваючого засобу і фарбуючого засобу.

Кілька варіантів здійснення відносяться до рослини, отриманої способом, що включає:
 5 вирощування рослини з насінини, причому насінина контактує з молекулою екзогенної dsRNA, що включає послідовність, яка по суті ідентична або по суті комплементарна до щонайменше 18 суміжних нуклеотидів гена комахи-шкідника або до послідовності РНК, транскрибованої зі згаданого гена, причому рослина має поліпшену стійкість до цієї комахи-шкідника в порівнянні з контрольною рослиною, причому контрольна рослина вирощена з насінини, не контактуючої з
 10 молекулою екзогенної dsRNA. У деяких варіантах здійснення рослиною є кукурудза, соя, рис, пшениця, томат, огірок, салат, бавовна або ріпак. У деяких варіантах здійснення комахою-шкідником є *Spodoptera littoralis*, *Diabrotica virgifera virgifera* або *Leptinotarsa decemlineata*. У деяких варіантах здійснення ген комахи-шкідника вибирають з групи, що складається з АТФази, NADPH- (цитохром Р450)-оксидоредуктази, інгібітора апоптозних білків, хітинсинтази, EF1α і β-актину. У деяких варіантах здійснення молекула екзогенної dsRNA включає послідовність, яка по суті ідентична або по суті комплементарна до щонайменше 18 суміжних нуклеотидів послідовностей SEQ ID No: 21-26, 31, 34, 37, 38, 131-133, 144 або 145. У деяких варіантах здійснення молекула екзогенної dsRNA включає послідовність, яка по суті ідентична або по суті комплементарна до щонайменше 18 суміжних нуклеотидів послідовностей SEQ ID No: 146-190.
 20 У деяких варіантах здійснення молекула екзогенної dsRNA включає нуклеїнокислотну послідовність, яка щонайменше на 80% ідентична ендегенному гену рослини щонайменше на 25 послідовних парах основ. У деяких варіантах здійснення насінину крім того обробляють агентом, що вибирається з групи, яка складається з пестициду, фунгіциду, інсектициду, добрива, покриваючого засобу і фарбуючого засобу. У деяких варіантах здійснення рослина не
 25 включає порогові виявлення молекули екзогенної dsRNA.

Кілька варіантів здійснення відносяться до способу отримання рослини, що має підвищену стійкість до комах-шкідників, причому спосіб включає вирощування рослини з насінини, причому насінина включає молекулу екзогенної dsRNA, що включає послідовність, яка по суті ідентична або по суті комплементарна до щонайменше 18 суміжних нуклеотидів гена комахи-шкідника або
 30 до послідовності РНК, транскрибованої зі згаданого гена, причому насіння позбавлене гетерологічного промотора для стимуляції експресії молекули екзогенної dsRNA, і причому рослина має поліпшену стійкість до цієї комахи-шкідника в порівнянні з контрольною рослиною, причому контрольна рослина вирощена з насінини, що не включає молекулу екзогенної dsRNA. У деяких варіантах здійснення рослиною є кукурудза, соя, рис, пшениця, томат, огірок, салат, бавовна або ріпак. У деяких варіантах здійснення комахою-шкідником є *Spodoptera littoralis*, *Diabrotica virgifera virgifera* або *Leptinotarsa decemlineata*. У деяких варіантах здійснення ген комах-шкідника вибирають з групи, що складається з АТФази, NADPH- (цитохром Р450)-оксидоредуктази, інгібітора апоптозних білків, хітинсинтази, EF1α і β-актину. У деяких варіантах здійснення молекула екзогенної dsRNA включає послідовність, яка по суті ідентична або по суті
 40 комплементарна до щонайменше 18 суміжних нуклеотидів послідовності SEQ ID No: 21-26, 31, 34, 37, 38, 131-133, 144 або 145. У деяких варіантах здійснення молекула екзогенної dsRNA включає послідовність, яка по суті ідентична або по суті комплементарна до щонайменше 18 суміжних нуклеотидів послідовності SEQ ID No: 146-190. У деяких варіантах здійснення молекула екзогенної dsRNA включає нуклеїнокислотну послідовність, яка щонайменше на 80% ідентична ендегенному гену рослини щонайменше на 25 послідовних парах основ. У деяких
 45 варіантах здійснення насінину крім того обробляють агентом, що вибирається з групи, яка складається з пестициду, фунгіциду, інсектициду, добрива, покриваючого засобу і фарбуючого засобу.

Кілька варіантів здійснення відносяться до рослини, отриманої способом, що включає
 50 вирощування рослини з насінини, причому насінина включає молекулу екзогенної dsRNA, що включає послідовність, яка по суті ідентична або по суті комплементарна до щонайменше 18 суміжних нуклеотидів гена комахи-шкідника або до послідовності РНК, транскрибованої зі згаданого гена, причому насіння позбавлене гетерологічного промотора для стимуляції експресії молекули екзогенної dsRNA, і причому рослина має поліпшену стійкість до цієї комахи-шкідника в порівнянні з контрольною рослиною, причому контрольна рослина вирощена з насінини, яка не включає молекулу екзогенної dsRNA. У деяких варіантах здійснення рослиною є кукурудза, соя, рис, пшениця, томат, огірок, салат, бавовна або ріпак. У деяких варіантах здійснення комахою-шкідником є *Spodoptera littoralis*, *Diabrotica virgifera virgifera* або *Leptinotarsa decemlineata*. У деяких варіантах здійснення ген комах-шкідника вибирають з групи, що
 60 складається з АТФази, NADPH-(цитохром Р450)-оксидоредуктази, інгібітора апоптозних білків,

хитинсинтази, EF1 α і β -актину. У деяких варіантах здійснення молекула екзогенної dsRNA включає послідовність, яка по суті ідентична або по суті комплементарна до щонайменше 18 суміжних нуклеотидів послідовності SEQ ID No: 21-26, 31, 34, 37, 38, 131-133, 144 або 145. У деяких варіантах здійснення молекула екзогенної dsRNA включає послідовність, яка по суті ідентична або по суті комплементарна до щонайменше 18 суміжних нуклеотидів послідовності SEQ ID No: 146-190. У деяких варіантах здійснення молекула екзогенної dsRNA включає нуклеїнокислотну послідовність, яка щонайменше на 80% ідентична ендегенному гену рослини щонайменше на 25 послідовних парах основ. У деяких варіантах здійснення насінину крім того обробляють агентом, що вибирається з групи, яка складається з пестициду, фунгіциду, інсектициду, добрива, покриваючого засобу і фарбуючого засобу. У деяких варіантах здійснення рослина не включає пороги виявлення молекули екзогенної dsRNA.

Кілька варіантів здійснення відносяться до способу отримання рослини, яка має стійкість до комах, причому спосіб включає: а) введення молекули нетранскрибованого тригера, що включає щонайменше один ланцюг полінуклеотидів, який включає щонайменше один сегмент із 18 або більше суміжних нуклеотидів гена комах-шкідника в антисмисловій або смисловій орієнтації, в непророслу насінину і б) пророщування насінини для отримання рослини, що проявляє стійкість до комах після появи зі згаданої насінини. У деяких варіантах здійснення рослина не включає пороги виявлення молекули тригера після появи з насінини. У деяких варіантах здійснення молекулою нетранскрибованого тригера є dsRNA. У деяких варіантах здійснення ген комах-шкідника вибирають з групи, що складається з АТФази, NADPH- (цитохром Р450)-оксидоредуктази, інгібітора апоптозних білків, хитинсинтази, EF1 α і β -актину. У деяких варіантах здійснення рослина стійка до інвазії *Spodoptera littoralis*, *Diabrotica virgifera virgifera* або *Leptinotarsa decemlineata*. У деяких варіантах здійснення молекула нетранскрибованого тригера включає послідовність, яка по суті ідентична або по суті комплементарна до щонайменше 18 суміжних нуклеотидів послідовності SEQ ID No: 21-26, 31, 34, 37, 38, 131-133, 144 або 145. У деяких варіантах здійснення молекула нетранскрибованого тригера включає послідовність, яка по суті ідентична або по суті комплементарна до щонайменше 18 суміжних нуклеотидів послідовності SEQ ID No: 146-190. У деяких варіантах здійснення молекула нетранскрибованого тригера щонайменше на 80% ідентична ендегенному гену рослини щонайменше на 25 послідовних парах основ. У деяких варіантах здійснення насінину попередньо замочують у праймінговому розчині перед введенням молекули нетранскрибованого тригера. У деяких варіантах здійснення праймінг здійснюють шляхом: (i) промивки насінини перед згаданим контактом і (ii) сушіння насінини після етапу (i).

Кілька варіантів здійснення відносяться до способу обробки насінини для поліпшення стійкості до комах рослини, вирощеної з такої насінини, причому спосіб включає: введення молекули екзогенної dsRNA, що включає послідовність, яка по суті ідентична або по суті комплементарна до щонайменше 18 суміжних нуклеотидів гена комах-шкідника або до послідовності РНК, транскрибованої з гена комах-шкідника в насінину, причому рослина, вирощена з насінини, має поліпшену стійкість до комах в порівнянні з контрольною рослиною. У деяких варіантах здійснення молекула екзогенної dsRNA включає послідовність, яка по суті ідентична або по суті комплементарна до щонайменше 18 суміжних нуклеотидів послідовності SEQ ID No: 21-26, 31, 34, 37, 38, 131-133, 144 або 145. У деяких варіантах здійснення молекула екзогенної dsRNA включає послідовність, яка по суті ідентична або по суті комплементарна до щонайменше 18 суміжних нуклеотидів послідовності SEQ ID No: 146-190. У деяких варіантах здійснення насінину замочують у праймінговому розчині перед введенням молекули екзогенної dsRNA. У деяких варіантах здійснення праймінг здійснюють шляхом: (i) промивки насінини перед згаданим контактом і (ii) сушіння насінини після етапу (i). У деяких варіантах здійснення насінину промивають у двічі деіонізованій воді. У деяких варіантах здійснення насінину промивають протягом 2 – 6 годин. У деяких варіантах здійснення насінину промивають при 4 - 28 °C. У деяких варіантах здійснення насінину сушать при 25 - 30 °C протягом 10 - 16 годин. У деяких варіантах здійснення молекулу dsRNA вводять в насінину в концентрації 20 - 150 мкг/мл. У деяких варіантах здійснення молекулу dsRNA вводять в насінину в розчині, що включає 0,1 мМ ЕДТА (етилендіамінтетраоцтова кислота, далі ЕДТА або EDTA). У деяких варіантах здійснення молекулу dsRNA вводять в насінину в присутності фізичного агента. У деяких варіантах здійснення фізичним агентом є ПЕГ(поліетиленгліколь, далі ПЕГ)-модифіковані вуглецеві нанотрубки.

Кілька варіантів здійснення відносяться до насінини, отриманої способом, що включає введення молекули екзогенної dsRNA, яка включає послідовність, яка по суті ідентична або по суті комплементарна до щонайменше 18 суміжних нуклеотидів гена комах-шкідника або до послідовності РНК, транскрибованої з гена комах-шкідника в насінину, причому рослина,

вирощена з насінини, має поліпшену стійкість до комах в порівнянні з контрольною рослиною. У деяких варіантах здійснення молекула екзогенної dsRNA включає послідовність, яка по суті ідентична або по суті комплементарна до щонайменше 18 суміжних нуклеотидів послідовності SEQ ID No: 21-26, 31, 34, 37, 38, 131-133, 144 або 145. У деяких варіантах здійснення молекула екзогенної dsRNA включає послідовність, яка по суті ідентична або по суті комплементарна до щонайменше 18 суміжних нуклеотидів послідовності SEQ ID No: 146-190. У деяких варіантах здійснення насінину замочують у праймінговому розчині перед введенням молекули екзогенної dsRNA. У деяких варіантах здійснення праймінг здійснюють шляхом: (i) промивки насінини перед згаданим контактом і (ii) сушіння насінини після етапу (i). У деяких варіантах здійснення насінину промивають у двічі деіонізованій воді. У деяких варіантах здійснення насінину промивають протягом 2 – 6 годин. У деяких варіантах здійснення насінину промивають при 4 - 28 °C. У деяких варіантах здійснення насінину сушать при 25 - 30 °C протягом 10 - 16 годин. У деяких варіантах здійснення молекулу dsRNA вводять в насінину в концентрації 20 - 150 мкг/мл. У деяких варіантах здійснення молекулу dsRNA вводять в насінину в розчині, що включає 0,1 mM EDTA. У деяких варіантах здійснення молекулу dsRNA вводять в насінину в присутності фізичного агента. У деяких варіантах здійснення фізичним агентом є ПЕГ-модифіковані вуглецеві нанотрубки. Кілька варіантів здійснення відносяться до пристрою для вміщення насінини, що включає одну або більше насінини. Кілька варіантів здійснення відносяться до засіяного поля, що включає деяку кількість такого насіння.

Кілька варіантів здійснення відносяться до насінини, що включає молекулу екзогенної dsRNA, що включає послідовність, яка по суті ідентична або по суті комплементарна до щонайменше 18 суміжних нуклеотидів гена комах-шкідника або до послідовності РНК, транскрибованої з гена комах-шкідника, причому насінина позбавлена гетерологічного промотора для стимуляції експресії згаданої молекули dsRNA, і причому екзогенна dsRNA не інтегрується в геном насінини. У деяких варіантах здійснення молекула екзогенної dsRNA присутня в ендоспермі насінини. У деяких варіантах здійснення молекула екзогенної dsRNA включає послідовність, яка по суті ідентична або по суті комплементарна до щонайменше 18 суміжних нуклеотидів послідовності SEQ ID No: 21-26, 31, 34, 37, 38, 131-133, 144 або 145. У деяких варіантах здійснення молекула екзогенної dsRNA включає послідовність, яка по суті ідентична або по суті комплементарна до щонайменше 18 суміжних нуклеотидів послідовності SEQ ID No: 146-190. У деяких варіантах здійснення молекула екзогенної dsRNA є у зародку насінини. У деяких варіантах здійснення молекула екзогенної dsRNA присутня в подібній концентрації в зародку і ендоспермі насінини. У деяких варіантах здійснення молекула екзогенної dsRNA присутня в ендоспермі в більш високій концентрації ніж у зародку і насінині. У деяких варіантах здійснення ген комах-шкідника вибирають з групи, що складається з АТФази, NADPH- (цитохром Р450)-оксидоредуктази, інгібітора апоптозних білків, хітинсинтази, EF1 α і β -актину. У деяких варіантах здійснення комахо-шкідником є *Spodoptera littoralis*, *Diabrotica virgifera virgifera* або *Leptinotarsa decemlineata*. У деяких варіантах здійснення молекула екзогенної dsRNA включає нуклеїнокислотну послідовність, яка щонайменше на 80% ідентична ендогенному гену насінини щонайменше на 25 послідовних парах основ. У деяких варіантах здійснення насінину обробляють агентом, що вибирається з групи, яка складається з пестициду, фунгіциду, інсектициду, добрива, покриваючого засобу і фарбуючого засобу. У деяких варіантах здійснення насінина є замочена в праймінговому розчині насінина. Кілька варіантів здійснення відносяться до пристрою, який вміщує насінину, що включає одну або більше насінини. Кілька варіантів здійснення відносяться до засіяного поля, що включає деяку кількість такого насіння.

Кілька варіантів здійснення відносяться до рослини, що проявляє стійкість до комах після появи з насінини, причому молекулу нетранскрибованого тригера, що включає щонайменше один ланцюг полінуклеотидів, який включає щонайменше один сегмент із 18 або більше суміжних нуклеотидів гена комах-шкідника в антисмисловій або смисловій орієнтації, вводять в непророслу насіннину, з якої виростає згадана рослина. У деяких варіантах здійснення рослину вибирають з групи, що складається з кукурудзи, сої, рису, пшениці, томату, огірка, салату, бавовни і ріпаку. У деяких варіантах здійснення рослина не включає поріг виявлення молекули нетранскрибованого тригера. У деяких варіантах здійснення ген комах-шкідника вибирають з групи, що складається з АТФази, NADPH- (цитохром Р450)-оксидоредуктази, інгібітора апоптозних білків, хітинсинтази, EF1 α і β -актину. У деяких варіантах здійснення молекула нетранскрибованого тригера включає послідовність, яка по суті ідентична або по суті комплементарна до щонайменше 18 суміжних нуклеотидів послідовності SEQ ID No: 21-26, 31, 34, 37, 38, 131-133, 144 або 145. У деяких варіантах здійснення молекула нетранскрибованого тригера включає послідовність, яка по суті ідентична або по суті комплементарна до щонайменше 18 суміжних нуклеотидів послідовності SEQ ID No: 146-190. У деяких варіантах

здійснення молекула нетранскрибованого тригера включає нуклеїнокислотну послідовність, яка щонайменше на 80% ідентична ендегенному гену насінини щонайменше на 25 послідовних парах основ. У деяких варіантах здійснення молекула нетранскрибованого тригера включає нуклеїнокислотну послідовність, яка має довжину щонайменше 17 пар основ і щонайменше на 85% ідентична ендегенному гену насінини. У деяких варіантах здійснення молекула нетранскрибованого тригера включає нуклеїнокислотну послідовність, яка має довжину щонайменше 70 пар основ і щонайменше на 65% ідентична ендегенному гену насінини.

Кілька варіантів здійснення відносяться до рослини, що включає молекулу нуклеїнової кислоти для пригнічення гена комахи-шкідника, причому молекула нуклеїнової кислоти не інтегрована в хромосому рослини, причому молекула нуклеїнової кислоти не транскрибована з гомологічного трансгена, інтегрованого в хромосому рослини, і причому ген комахи-шкідника пригнічений шляхом введення молекули тригера, що включає щонайменше один ланцюг полінуклеотидів, який включає щонайменше один сегмент із 18 або більше суміжних нуклеотидів гена комахи-шкідника в антисмисловій орієнтації, в непророслу насінину, з якої виростає рослина. У деяких варіантах здійснення рослини вибирають з групи, що складається з кукурудзи, сої, рису, пшениці, томату, огірка, салату, бавовни і ріпаку. У деяких варіантах здійснення молекулою тригера є dsRNA. У деяких варіантах здійснення ген комахи-шкідника вибирають з групи, що складається з АТФази, NADPH-(цитохром Р450)-оксидоредуктази, інгібітора апоптозних білків, хітинсинтази, EF1 α і β -актину. У деяких варіантах здійснення тригерна молекула включає послідовність, яка по суті ідентична або по суті комплементарна до щонайменше 18 суміжних нуклеотидів послідовності SEQ ID No: 21-26, 31, 34, 37, 38, 131-133, 144 або 145. У деяких варіантах здійснення тригерна молекула включає послідовність, яка по суті ідентична або по суті комплементарна до щонайменше 18 суміжних нуклеотидів послідовності SEQ ID No: 146-190. У деяких варіантах здійснення тригерна молекула включає нуклеїнокислотну послідовність, яка щонайменше на 80% ідентична щонайменше на 25 послідовних парах основ ендегенному гену насінини, з якої виростає рослина. У деяких варіантах здійснення тригерна молекула включає нуклеїнокислотну послідовність, яка має довжину щонайменше 17 пар основ і щонайменше на 85% ідентична ендегенному гену насінини, з якої виростає рослина. У деяких варіантах здійснення тригерна молекула включає нуклеїнокислотну послідовність, яка має довжину щонайменше 70 пар основ і щонайменше на 65% ідентична ендегенному гену насінини, з якої виростає рослина. У деяких варіантах здійснення рослина не включає поріг виявлення молекули тригера.

Кілька варіантів здійснення відносяться до способу зниження тиску личинки західного кукурудзяного жука на рослину кукурудзи, причому спосіб включає: а) введення молекули тригера, що включає щонайменше один ланцюг полінуклеотидів, який включає щонайменше один сегмент із 18 або більше суміжних нуклеотидів гена личинки західного кукурудзяного жука в антисмисловій або смисловій орієнтації, в непророслу насінину кукурудзи та б) пророщування насінини кукурудзи для отримання рослини кукурудзи. У деяких варіантах здійснення молекулою тригера є dsRNA. У деяких варіантах здійснення тригерна молекула включає щонайменше один сегмент із 18 або більше суміжних нуклеотидів послідовності SEQ ID No. 144. У деяких варіантах здійснення тригерна молекула включає щонайменше один сегмент із 18 або більше суміжних нуклеотидів послідовності SEQ ID No: 146-190. У деяких варіантах здійснення непророслу насінину кукурудзи замочують у праймінговому розчині перед введенням молекули тригера. У деяких варіантах здійснення насінину замочують у праймінговому розчині шляхом: (i) промивки насінини перед згаданим контактом і (ii) сушіння насінини після етапу (i). У деяких варіантах здійснення насінину промивають у двічі деіонізованій воді.

Кілька варіантів здійснення відносяться до способу отримання рослини, що має поліпшену стійкість до вірусів, причому спосіб включає: вирощування рослини з насінини, причому насінина контактує з молекулою екзогенної dsRNA, що включає послідовність, яка по суті ідентична або по суті комплементарна до щонайменше 18 суміжних нуклеотидів гена вірусу або до послідовності РНК, транскрибованої зі згаданого гена, причому рослина має поліпшену стійкість до вірусів в порівнянні з контрольною рослиною, причому контрольна рослина вирощена з насінини, яка не контактувала з молекулою екзогенної dsRNA. У деяких варіантах здійснення рослиною є кукурудза, соя, рис, пшениця, томат, огірок, салат, бавовна або ріпак. У деяких варіантах здійснення вірусом є вірус золотої крапчастості томату (далі ВЗКТ або ToGMoV), вірус мозаїки огірка (цитомегаловірус, далі ЦМВ або CMV) або вірус плямистого в'янення томата (далі ВПВТ або TSWV). У деяких варіантах здійснення ген вірусу вибирають з групи, що складається з гена ToGMoV, гена CMV і гена TSWV. У деяких варіантах здійснення ген вірусу вибирають з групи, що складається з гена нуклеокапсида (N), гена реплікази, гена оболонки і гена AC1. У деяких варіантах здійснення молекула екзогенної dsRNA включає

послідовність, яка по суті ідентична або по суті комплементарна до щонайменше 18 суміжних нуклеотидів послідовності SEQ ID No: 8, 11 або 185-190. У деяких варіантах здійснення молекула екзогенної dsRNA включає нуклеїнокислотну послідовність, яка щонайменше на 80% ідентична ендегенному гену рослини щонайменше на 25 послідовних парах основ. У деяких

5

варіантах здійснення насінину крім того обробляють агентом, що вибирається з групи, яка складається з пестициду, фунгіциду, інсектициду, добрива, покриваючого засобу і фарбуючого засобу.

Кілька варіантів здійснення відносяться до рослини, отриманої способом, що включає: вирощування рослини з насінини, причому насінина контактує з молекулою екзогенної dsRNA, що включає послідовність, яка по суті ідентична або по суті комплементарна до щонайменше 18 суміжних нуклеотидів гена вірусу або до послідовності РНК транскрибованої зі згаданого гена, причому рослина має поліпшену стійкість до вірусу в порівнянні з контрольною рослиною, причому контрольна рослина вирощена з насінини, яка не контактувала з молекулою екзогенної dsRNA. У деяких варіантах здійснення рослиною є кукурудза, соя, рис, пшениця, томат, огірок, салат, бавовна або ріпак. У деяких варіантах здійснення вірусом є вірус золотої крапчастості томату (ToGMoV), вірус мозаїки огірка (CMV) або вірус плямистого в'янення томата (TSWV). У деяких варіантах здійснення ген вірусу вибирають з групи, що складається з гена ToGMoV, гена CMV і гена TSWV. У деяких варіантах здійснення ген вірусу вибирають з групи, що складається з гена нуклеокапсида (N), гена реплікази, гена оболонки і гена AC1. У деяких варіантах здійснення молекула екзогенної dsRNA включає послідовність, яка по суті ідентична або по суті комплементарна до щонайменше 18 суміжних нуклеотидів послідовності SEQ ID No: 8, 11 або 185-190. У деяких варіантах здійснення молекула екзогенної dsRNA включає нуклеїнокислотну послідовність, яка щонайменше на 80% ідентична ендегенному гену рослини щонайменше на 25 послідовних парах основ. В деяких варіантах здійснення насінину крім того обробляють агентом, що вибирається з групи, яка складається з пестициду, фунгіциду, інсектициду, добрива, покриваючого засобу і фарбуючого засобу. У деяких варіантах здійснення рослина не включає порогові виявлення молекули екзогенної dsRNA.

10

15

20

25

Кілька варіантів здійснення відносяться до способу отримання рослини, що має поліпшену стійкість до вірусів, причому спосіб включає вирощування рослини з насінини, причому насінина включає молекулу екзогенної dsRNA, що включає послідовність, яка по суті ідентична або по суті комплементарна до щонайменше 18 суміжних нуклеотидів гена вірусу або до послідовності РНК, транскрибованої зі згаданого гена, причому насінина позбавлена гетерологічного промотора для стимуляції експресії молекули екзогенної dsRNA, і причому рослина має поліпшену стійкість до вірусів в порівнянні з контрольною рослиною, причому контрольна рослина вирощена з насінини, що не включає молекулу екзогенної dsRNA. У деяких варіантах здійснення вірусом є вірус золотої крапчастості томату (ToGMoV), вірус мозаїки огірка (CMV) або вірус плямистого в'янення томата (TSWV). У деяких варіантах здійснення ген вірусу вибирають з групи, що складається з гена ToGMoV, гена CMV і гена TSWV. У деяких варіантах здійснення ген вірусу вибирають з групи, що складається з гена нуклеокапсида (N), гена реплікази, гена оболонки і гена AC1. У деяких варіантах здійснення молекула екзогенної dsRNA включає послідовність, яка по суті ідентична або по суті комплементарна до щонайменше 18 суміжних нуклеотидів послідовності SEQ ID No: 8, 11 або 185-190. У деяких варіантах здійснення молекула екзогенної dsRNA включає нуклеїнокислотну послідовність, яка щонайменше на 80% ідентична ендегенному гену рослини щонайменше на 25 послідовних парах основ. У деяких варіантах здійснення насінину крім того обробляють агентом, що вибирається з групи, яка складається з пестициду, фунгіциду, інсектициду, добрива, покриваючого засобу і фарбуючого засобу.

30

35

40

45

Кілька варіантів здійснення відносяться до рослини, отриманої способом, що включає вирощування рослини з насінини, причому насінина включає молекулу екзогенної dsRNA, що включає послідовність, яка по суті ідентична або по суті комплементарна до щонайменше 18 суміжних нуклеотидів гена вірусу або до послідовності РНК, транскрибованої зі згаданого гена, причому насінина позбавлена гетерологічного промотора для стимуляції експресії молекули екзогенної dsRNA, і причому рослина має поліпшену стійкість до вірусів в порівнянні з контрольною рослиною, причому контрольна рослина вирощена з насінини, що не включає молекулу екзогенної dsRNA. У деяких варіантах здійснення рослиною є кукурудза, соя, рис, пшениця, томат, огірок, салат, бавовна або ріпак. У деяких варіантах здійснення вірусом є вірус золотої крапчастості томату (ToGMoV), вірус мозаїки огірка (CMV) або вірус плямистого в'янення томата (TSWV). У деяких варіантах здійснення ген вірусу вибирають з групи, що складається з гена ToGMoV, гена CMV і гена TSWV. У деяких варіантах здійснення ген вірусу вибирають з групи, що складається з гена нуклеокапсида (N), гена реплікази, гена оболонки і

50

55

60

гена AC1. У деяких варіантах здійснення молекула екзогенної dsRNA включає послідовність, яка по суті ідентична або по суті комплементарна до щонайменше 18 суміжних нуклеотидів послідовності SEQ ID No: 8, 11 або 185-190. У деяких варіантах здійснення молекула екзогенної dsRNA включає нуклеїнокислотну послідовність, яка щонайменше на 80% ідентична

ендогенному гену рослини щонайменше на 25 послідовних парах основ. В деяких варіантах здійснення насінину крім того обробляють агентом, що вибирається з групи, яка складається з пестициду, фунгіциду, інсектициду, добрива, покриваючого засобу і фарбуючого засобу. У деяких варіантах здійснення рослина не включає порогові виявлення молекули екзогенної dsRNA.

Кілька варіантів здійснення відносяться до способу отримання рослини, що має стійкість до вірусів, причому спосіб включає: а) введення молекули нетранскрибованого тригера, що включає щонайменше один ланцюг полінуклеотидів, який включає щонайменше один сегмент із 18 або більше суміжних нуклеотидів гена вірусу в антисмисловій або смисловій орієнтації, в неперорослу насінину і б) пророщування насінини для отримання рослини, яка виявляє стійкість до вірусів після появи зі згаданої насінини. У деяких варіантах здійснення рослина не включає порогові виявлення молекули тригера після появи з насінини. У деяких варіантах здійснення молекулою нетранскрибованого тригера є dsRNA. У деяких варіантах здійснення вірусом є вірус золотої крапчастості томату (ToGMoV), вірус мозаїки огірка (CMV) або вірус плямистого в'янення томата (TSWV). У деяких варіантах здійснення ген вірусу вибирають з групи, що складається з гена ToGMoV, гена CMV і гена TSWV. У деяких варіантах здійснення ген вірусу вибирають з групи, що складається з гена нуклеокапсида (N), гена реплікази, гена оболонки і гена AC1. У деяких варіантах здійснення молекула нетранскрибованого тригера включає послідовність, яка по суті ідентична або по суті комплементарна до щонайменше 18 суміжних нуклеотидів послідовності SEQ ID No: 8, 11 або 185-190. У деяких варіантах здійснення молекула нетранскрибованого тригера щонайменше на 80% ідентична ендogenous гену рослини щонайменше на 25 послідовних парах основ. У деяких варіантах здійснення насінину замочують у праймінговому розчині перед введенням молекули нетранскрибованого тригера. У деяких варіантах здійснення праймінг здійснюють шляхом: (i) промивки насінини перед згаданим контактом і (ii) сушіння насінини після етапу (i).

Кілька варіантів здійснення відносяться до способу обробки насінини для поліпшення стійкості рослини, вирощеної з насінини, до вірусів, причому спосіб включає: введення молекули екзогенної dsRNA, що включає послідовність, яка по суті ідентична або по суті комплементарна до щонайменше 18 суміжних нуклеотидів гена вірусу або до послідовності РНК, транскрибованої з гена вірусу в насінину, причому рослина, вирощена з насінини, має поліпшену стійкість до вірусів в порівнянні з контрольною рослиною. У деяких варіантах здійснення молекула екзогенної dsRNA включає послідовність, яка по суті ідентична або по суті комплементарна до щонайменше 18 суміжних нуклеотидів послідовності SEQ ID No: 8, 11 або 185-190. У деяких варіантах здійснення насінину замочують у праймінговому розчині перед введенням молекули екзогенної dsRNA. У деяких варіантах здійснення праймінг здійснюють шляхом: (i) промивки насінини перед згаданим контактом і (ii) сушіння насінини після етапу (i). У деяких варіантах здійснення насінину промивають у двічі деіонізованій воді. У деяких варіантах здійснення насінину промивають протягом 2 – 6 годин. У деяких варіантах здійснення насінину промивають при 4 - 28 °C. У деяких варіантах здійснення насінину сушать при 25 - 30 °C протягом 10 - 16 годин. У деяких варіантах здійснення молекулу dsRNA вводять в насінину в концентрації 20 - 150 мкг/мл. У деяких варіантах здійснення молекулу dsRNA вводять в насінину в розчині, що включає 0,1 мМ ЕДТА. У деяких варіантах здійснення молекулу dsRNA вводять в насінину в присутності фізичного агента. У деяких варіантах здійснення фізичним агентом є ПЕГ-модифіковані вуглецеві нанотрубки.

Кілька варіантів здійснення відносяться до насінини, отриманої способом, що включає введення молекули екзогенної dsRNA, що включає послідовність, яка по суті ідентична або по суті комплементарна до щонайменше 18 суміжних нуклеотидів гена вірусу або до послідовності РНК, транскрибованої з гена вірусу в насінину, причому рослина, вирощена з насінини, має поліпшену стійкість до вірусів в порівнянні з контрольною рослиною. У деяких варіантах здійснення молекула екзогенної dsRNA включає послідовність, яка по суті ідентична або по суті комплементарна до щонайменше 18 суміжних нуклеотидів послідовності SEQ ID No: 8, 11 або 185-190. У деяких варіантах здійснення насінину замочують у праймінговому розчині перед введенням молекули екзогенної dsRNA. У деяких варіантах здійснення праймінг здійснюють шляхом: (i) промивки насінини перед згаданим контактом і (ii) сушіння насінини після етапу (i). У деяких варіантах здійснення насінину промивають у двічі деіонізованій воді. У деяких варіантах здійснення насінину промивають протягом 2 – 6 годин. У деяких варіантах здійснення насінину

промивають при 4 - 28 °C. У деяких варіантах здійснення насінину сушать при 25 - 30 °C протягом 10 - 16 годин. У деяких варіантах здійснення молекулу dsRNA вводять в насінину в концентрації 20 - 150 мкг/мл. У деяких варіантах здійснення молекулу dsRNA вводять в насінину в розчині, що включає 0,1 мМ ЕДТА. У деяких варіантах здійснення молекулу dsRNA вводять в насінину в присутності фізичного агента. У деяких варіантах здійснення фізичним агентом є ПЕГ-модифіковані вуглецеві нанотрубки. Кілька варіантів здійснення відносяться до пристрою для вміщення насінини, що включає одну або більше насінини. Кілька варіантів здійснення відносяться до засіяного поля, що включає деяку кількість такого насіння.

Кілька варіантів здійснення відносяться до насінини, що включає молекулу екзогенної dsRNA, що включає послідовність, яка по суті ідентична або по суті комплементарна до щонайменше 18 суміжних нуклеотидів гена вірусу або до послідовності РНК, транскрибованої з гена вірусу, причому насінина позбавлена гетерологічного промотора для стимуляції експресії згаданої молекули dsRNA, і причому екзогенна dsRNA не інтегрується в геном насінини. У деяких варіантах здійснення молекула екзогенної dsRNA присутня в ендоспермі насінини. У деяких варіантах здійснення молекула екзогенної dsRNA є у зародку насінини. У деяких варіантах здійснення молекула екзогенної dsRNA присутня в подібній концентрації в зародку і ендоспермі насінини. У деяких варіантах здійснення молекула екзогенної dsRNA присутня в ендоспермі в більш високій концентрації ніж у зародку і насінини. У деяких варіантах здійснення вірусом є вірус золотої крапчастості томату (ToGMoV), вірус мозаїки огірка (CMV) або вірус плямистого в'янення томата (TSWV). У деяких варіантах здійснення ген вірусу вибирають з групи, що складається з гена ToGMoV, гена CMV і гена TSWV. У деяких варіантах здійснення ген вірусу вибирають з групи, що складається з гена нуклеокапсида (N), гена реплікази, гена оболонки і гена AC1. У деяких варіантах здійснення молекула екзогенної dsRNA включає послідовність, яка по суті ідентична або по суті комплементарна до щонайменше 18 суміжних нуклеотидів послідовності SEQ ID No: 8, 11 або 185-190. У деяких варіантах здійснення молекула екзогенної dsRNA включає нуклеїнокислотну послідовність, яка щонайменше на 80% ідентична ендегенному гену насінини щонайменше на 25 послідовних парах основ. У деяких варіантах здійснення насінину обробляють агентом, що вибирається з групи, яка складається з пестициду, фунгіциду, інсектициду, добрива, покриваючого засобу і фарбуючого засобу. У деяких варіантах здійснення насінину замочують у праймінговому розчині. Кілька варіантів здійснення відносяться до пристрою для вміщення насінини, що включає одну або більше насінини. Кілька варіантів здійснення відносяться до засіяного поля, що включає деяку кількість такого насіння.

Кілька варіантів здійснення відносяться до рослини, що проявляє стійкість до вірусів після появи з насінини, причому молекулу нетранскрибованого тригера, що включає щонайменше один ланцюг полінуклеотидів, який включає щонайменше один сегмент із 18 або більше суміжних нуклеотидів гена вірусу в антисмисловій або смисловій орієнтації, вводять в неперорослу насінину, з якої виростає згадана рослина. У деяких варіантах здійснення рослину вибирають з групи, що складається з кукурудзи, сої, рису, пшениці, томату, огірка, салату, бавовни і ріпаку. У деяких варіантах здійснення рослина не включає поріг виявлення молекули нетранскрибованого тригера. У деяких варіантах здійснення вірусом є вірус золотої крапчастості томату (ToGMoV), вірус мозаїки огірка (CMV) або вірус плямистого в'янення томата (TSWV). У деяких варіантах здійснення ген вірусу вибирають з групи, що складається з гена ToGMoV, гена CMV і гена TSWV. У деяких варіантах здійснення ген вірусу вибирають з групи, що складається з гена нуклеокапсида (N), гена реплікази, гена оболонки і гена AC1. У деяких варіантах здійснення молекула нетранскрибованого тригера включає послідовність, яка по суті ідентична або по суті комплементарна до щонайменше 18 суміжних нуклеотидів послідовності SEQ ID No: 8, 11 або 185-190. У деяких варіантах здійснення молекула нетранскрибованого тригера включає нуклеїнокислотну послідовність, яка щонайменше на 80% ідентична ендегенному гену насінини щонайменше на 25 послідовних парах основ. У деяких варіантах здійснення молекула нетранскрибованого тригера включає нуклеїнокислотну послідовність, яка має довжину щонайменше 17 пар основ і щонайменше на 85% ідентична ендегенному гену насінини. У деяких варіантах здійснення молекула нетранскрибованого тригера включає нуклеїнокислотну послідовність, яка має довжину щонайменше 70 пар основ і щонайменше на 65% ідентична ендегенному гену насінини.

Кілька варіантів здійснення відносяться до рослини, що включає молекулу нуклеїнової кислоти для пригнічення гена вірусу, причому молекула нуклеїнової кислоти не інтегрована в хромосому рослини, причому молекула нуклеїнової кислоти не транскрибована з гомологічного трансгена інтегрованого в хромосому рослини, і причому ген вірусу пригнічений шляхом введення молекули тригера, що включає щонайменше один ланцюг полінуклеотидів, який

включає щонайменше один сегмент із 18 або більше суміжних нуклеотидів гена вірусу в антисмисловій або смисловій орієнтації, в непророслу насінину, з якої виростає рослина. У деяких варіантах здійснення рослину вибирають з групи, що складається з кукурудзи, сої, рису, пшениці, томату, огірка, салату, бавовни і ріпаку. У деяких варіантах здійснення молекулою тригера є dsRNA. У деяких варіантах здійснення вірусом є вірус золотої крапчастості томату (ToGMoV), вірус мозаїки огірка (CMV) або вірус плямистого в'янення томата (TSWV). У деяких варіантах здійснення ген вірусу вибирають з групи, що складається з гена ToGMoV, гена CMV і гена TSWV. У деяких варіантах здійснення ген вірусу вибирають з групи, що складається з гена нуклеокапсида (N), гена реплікази, гена оболонки і гена AC1. У деяких варіантах здійснення тригерна молекула включає послідовність, яка по суті ідентична або по суті комплементарна до щонайменше 18 суміжних нуклеотидів послідовності SEQ ID No: 8, 11 або 185-190. У деяких варіантах здійснення тригерна молекула включає нуклеїнокислотну послідовність, яка щонайменше на 80% ідентична щонайменше на 25 послідовних парах основ ендегенному гену насінини, з якого виростає рослина. У деяких варіантах здійснення тригерна молекула включає нуклеїнокислотну послідовність, яка має довжину щонайменше 17 пар основ і щонайменше на 85% ідентична ендегенному гену насінини, з якої виростає рослина. У деяких варіантах здійснення тригерна молекула включає нуклеїнокислотну послідовність, яка має довжину щонайменше 70 пар основ і щонайменше на 65% ідентична ендегенному гену насінини, з якої виростає рослина. У деяких варіантах здійснення рослина не включає поріг виявлення молекули тригера.

Якщо не вказано інше, всі технічні та/або наукові терміни, використанні в даному документі, мають таке ж значення, яке зазвичай розуміє середній фахівець в області, до якої належить винахід. Хоча на практичному здійсненні або при перевірці варіантів здійснення винаходу можуть бути використані способи і матеріали, подібні або еквівалентні описаним у даному документі, нижче наведені приклади способів і/або матеріалів. У разі суперечності опис винаходу до патенту, включаючи визначення, має перевагу. Крім цього, матеріали, способи і приклади є тільки ілюстративними і не призначені для введення обмежень.

Короткий опис креслень

Нижче, тільки для прикладу, описані деякі варіанти здійснення винаходу з посиланнями на прикладені креслення. Тепер, з конкретним посиланням на докладні креслення, хотілося б підкреслити, що конкретні деталі показані для прикладу і для цілей ілюстрації опису варіантів здійснення винаходу. Відповідно, опис, взятий разом з кресленнями, пояснює спеціалістам в даній області техніки, як здійснити на практиці варіанти здійснення винаходу.

На Фіг. 1 показані результати впливу за часом обробки siGLO насіння рису. Перевірили вплив часу інкубації з dsRNA siGLO на інтенсивність флуоресценції, що показує кількість і якість проникнення dsRNA. Зображення контрольного насіння, яке було залишене необробленим (1), отримували разом із зображеннями насіння, обробленого dsRNA siGLO, для чотирьох періодів інкубації: 10 хвилин (2), 3,5 години (3), 5,5 годин (4) і 24 години (5).

На Фіг. 2A-B показаний сайленсінг гена PDS-1 в рисі за допомогою суміші dsRNA/siRNA. Фіг. 2A - зображення пророслого насіння рису через 5 діб після обробки, контрольні зліва. Фіг. 2B - зображення пророслого насіння рису через 7 діб після обробки, контрольні знизу.

На Фіг. 3A-C показані рівні експресії PDS-1, визначені шляхом ПЛР (полімеразна ланцюгова реакція, далі ПЛР) в реальному часі. Фіг. 3A - зображення пророслого насіння рису через 7 діб після обробки, контрольні знизу. Фіг. 3B - зображення посадженого насіння рису через 5 тижнів після обробки, контрольна рослина зліва і має більш темний зелений колір в порівнянні з рослиною, яку піддали сайленсінгу за допомогою PDS-1. Фіг. 3C - РНК екстрагували з контрольних і підданих сайленсінгу за допомогою PDS-1 рослин, і рівні експресії PDS-1 перевірили шляхом ПЛР в реальному часі. Рівні експресії UBQ5 слугували в якості нормалізаторів, і рівні експресії PDS-1 в контрольних рослинах слугували в якості калібраторів і отримали значення 1.

На Фіг. 4A-B показано розподіл по висоті контрольних і NFY dsRNA-оброблених рослин томата через 55 діб після інокуляції. На Фіг. 4A показано розподіл по висоті контрольних рослин (сині стовпці), і на Фіг. 4B показано розподіл по висоті оброблених рослин (жовті стовпчики).

На Фіг. 5A-D показано специфічний розподіл по висоті контрольних (сині стовпці) і ARF8 dsRNA-оброблених (червоно-коричневі стовпчики) рослин томата через 55 (Фіг. 5A), 62 (Фіг. 5B) і 72 діб (Фіг. 5C) після обробки. На Фіг. 5D показана середня висота контрольних рослин в порівнянні з висотою оброблених рослин через 62 діб після обробки.

На Фіг. 6A-B показані результати 3Т-ПЛР (полімеразна ланцюгова реакція з зворотною транскрипцією, далі 3Т-ПЛР) на РНК, екстрагованої з листя контрольних і FW2.2 dsRNA-оброблених рослин томата через 9 тижнів після проростання. На Фіг. 6A показано кратну зміну

експресії FW2.2 в контрольних (червоні стовпчики) і dsRNA-оброблених (сині стовпці) рослинах, яку нанесено на графік для кожної окремої рослини, щоб продемонструвати зміну в рівні експресії гена FW2.2 в цих двох групах рослин. На Фіг. 6B показана середня експресія FW2.2 в контрольних (червоний стовпець) в порівнянні з обробленими рослинами (синій стовпець).
 5 Зниження рівня експресії гена FW2.2 очевидно у оброблених рослин в порівнянні з контрольними рослинами.

На Фіг. 7A-B показана більш довга і більш розвинена коренева система у паростків рису, вирощених з насіння рису, оброблених проти гена Della (Фіг. 7B), в порівнянні з контрольними рослинами (Фіг. 7A).

10 На Фіг. 8A-B показані довші і більш розвинуті системи коренів і пагонів у паростків рису, вирощених з насіння рису, оброблених проти гена NRR (Фіг. 8B) в порівнянні з контрольними рослинами (Фіг. 8A), коли паростки виростили в середовищі для росту без азоту.

На Фіг. 9A-C показана гомологія між генами *Spodoptera littoralis*, які використані для обробки насінини, і геномом кукурудзи. Фіг. 9A - ген NADPH, послідовність 1 (верхня панель, SEQ ID NO: 14 і 22) і послідовність 2 (нижня панель, SEQ ID NO: 23 і 24) з 82% -ю ідентичністю на 71 нуклеотиді і 89% -ю ідентичністю на 35 нуклеотидах, відповідно. Фіг. 9B - АТФаза (SEQ ID NO: 25 і 26) з 72%-ю ідентичністю на 484 нуклеотидах, і Фіг. 9C - інгібітор апоптозних білків, послідовність 1 (верхня панель, SEQ ID NO: 27 і 28) і послідовність 2 (нижня панель, SEQ ID NO: 29 і 30) з 81% -ю ідентичністю на 36 нуклеотидах і 87% -ю ідентичністю на 31 нуклеотиді, відповідно. "Query" позначає послідовності *S. littoralis*, і "Subject" позначає послідовності кукурудзи.

На Фіг. 10A-C показана гомологія між генами *Spodoptera littoralis*, які використані для обробки насінини, і геномом томата. Фіг. 10A - ген NADPH, послідовність 1 (верхня панель, SEQ ID NO: 31 і 32) з 93% -ю ідентичністю на 30 нуклеотидах і 88% -ю ідентичністю на 25 нуклеотидах, відповідно і послідовність 2 (нижня панель, SEQ ID NO: 33 і 34). Фіг. 10B - АТФаза (SEQ ID No: 35 і 36) з 73%-ю ідентичністю на 359 нуклеотидах, і Фіг. 10C - інгібітор апоптозних білків (SEQ ID No: 37 і 38) з 93%-ю ідентичністю на 28 нуклеотидах. "Query" позначає послідовності *S. littoralis*, і "Subject" позначає послідовності томата.

На Фіг. 11A-D показані стовпчасті діаграми, що показують смертність і середню масу живих личинок *S. littoralis*. На Фіг. 11A показаний відсоток мертвих личинок через вісім діб після годування трьома обробленими молекулою тригера dsRNA АТФази віком 43 днів і контрольними рослинами кукурудзи. На Фіг. 11B показана середня маса живих личинок *S. littoralis* в той же момент часу. Фіг. 11C - стовпчаста діаграма, що показує відсоток мертвих личинок *S. littoralis* через три доби після годування обробленими АТФазой віком 85 діб і контрольними рослинами кукурудзи. Фіг. 11D - стовпчаста діаграма, що показує відсоток мертвих личинок *S. littoralis* через сім діб після годування обробленими молекулою тригера dsRNA АТФази віком 91 добу і контрольними рослинами кукурудзи.

Фіг. 12 - стовпчаста діаграма, що показує відсоток мертвих личинок *S. littoralis* через сім діб після годування обробленими молекулою тригера dsRNA (NADPH, IAP (інгібітор апоптозних білків) і АТФаза) віком 67 діб і контрольними (ЕДТА) рослинами кукурудзи.

Фіг. 13A-B: Фіг. 13A - стовпчаста діаграма, що показує середню масу живих личинок *S. littoralis* через вісім діб після годування обробленими молекулою тригера dsRNA EF1 α віком 43 діб і контрольними (ЕДТА) рослинами кукурудзи. Фіг. 13B – стовпчаста діаграма, що показує відсоток мертвих личинок *S. littoralis* через п'ять діб після годування обробленими молекулою тригера dsRNA EF1 α віком 87 діб і контрольними (ЕДТА) рослинами кукурудзи.

Фіг. 14 - стовпчаста діаграма, що показує середню масу живих личинок *S. littoralis* через вісім діб після годування обробленими молекулою тригера dsRNA бета-актину віком 43 діб і контрольними (ЕДТА) рослинами кукурудзи.

Фіг. 15A-B: Фіг. 15A - стовпчаста діаграма, що показує середню масу живих личинок *S. littoralis* через вісім діб після годування обробленими молекулою тригера dsRNA NADPH віком 43 діб і контрольними (ЕДТА) рослинами кукурудзи. Фіг. 15B - стовпчаста діаграма показує відсоток мертвих личинок *S. littoralis* через сім діб після годування обробленими молекулою тригера dsRNA NADPH віком 91 добу і контрольними (ЕДТА) рослинами кукурудзи.

Фіг. 16A-B – стовпчасті діаграми, що показують середню масу живих личинок *S. littoralis* через шість діб після годування обробленими молекулою тригера dsRNA (IAP або MIX (інгібітор апоптозних білків), NADPH і АТФаза) віком 27 діб в порівнянні з контрольними (ЕДТА) рослинами. На Фіг. 16A показаний середній відсоток на одне повторення, і на Фіг. 16B показана середня маса на одну обробку.

Фіг. 17A-B - стовпчасті діаграми, що показують середню масу живих личинок *S. littoralis* після годування обробленими молекулою тригера dsRNA EF1 α рослинами кукурудзи. На Фіг. 17A

показана середня маса через дев'ять діб після годування рослинами віком 35 діб. Стовпці помилок представляють стандартне відхилення для кожної обробки. На Фіг. 17В показана середня маса через п'ять діб після годування рослинами віком 36 діб. Стовпці помилок представляють стандартне відхилення для кожної рослини.

5 Фіг. 18А-В: Фіг. 18А - стовпчаста діаграма, що показує відсоток мертвих личинок *S. littoralis* через 12 діб після годування обробленої молекулою тригера dsRNA АТФази віком 56 діб і контрольними (GUS (бета-глюконідаза, далі GUS)) рослинами кукурудзи. Фіг. 18В - стовпчаста діаграма, що показує відсоток мертвих личинок *S. littoralis* через чотири доби після годування обробленими молекулою тригера dsRNA АТФази віком 57 діб і контрольними (GUS) рослинами кукурудзи.

10 Фіг. 19А-В: Фіг. 19А - стовпчаста діаграма, що показує середню масу живих личинок *S. littoralis* через десять діб після годування обробленими молекулою тригера dsRNA віком 24 діб і контрольними (ЕДТА, ЕДТА/ПМВН (ПЕГ-модифіковані вуглецеві нанотрубки, далі ПМВН) і ЗФБ (зелений флуоресцентний білок, далі ЗФБ)) рослинами кукурудзи. Стовпці помилок представляють стандартне відхилення для кожної рослини. Фіг. 19В - стовпчаста діаграма, що показує середню масу живих личинок *S. littoralis* через десять діб після годування обробленими молекулою тригера dsRNA віком 25 діб і контрольними (ЕДТА, ЕДТА/ПМВН і ЗФБ/ПМВН) рослинами кукурудзи. Стовпці помилок представляють стандартне відхилення для кожної рослини.

20 Фіг. 20А-В - стовпчасті діаграми, що показують середню масу личинок *S. littoralis* через 4 доби після годування обробленими молекулою тригера dsRNA віком вісім діб (EF1 α і EF1 α /ПМВН) і контрольними (GUS і GUS/ПМВН) рослинами кукурудзи. На Фіг. 20А показана середня маса личинок *S. littoralis* на одну рослину, і на Фіг. 20В показана середня маса личинок *S. littoralis* на одну обробку. Стовпці помилок представляють стандартне відхилення даних.

25 Фіг. 21 - стовпчаста діаграма, що показує середню масу живих личинок *S. littoralis* через три і сім діб після годування обробленими молекулою тригера dsRNA (NADPH, інгібітор апоптозних білків, і MIX (інгібітор апоптозних білків, АТФаза і NADPH)) віком 48 діб і контрольними (ЕДТА) рослинами томата.

30 Фіг. 22 - стовпчаста діаграма, що показує середню масу живих личинок *S. littoralis* після годування протягом чотирьох діб обробленими молекулою тригера dsRNA (бета-актину, АТФази і NADPH) віком 42 доби і контрольними (ЕДТА) рослинами томата.

35 Фіг. 23А-В: Фіг. 23А - стовпчаста діаграма, що показує масу личинок *S. littoralis* після годування протягом шести діб обробленими молекулою тригера dsRNA АТФази віком 85 діб і контрольними (ЕДТА) рослинами томату щодо їх початкової маси до годування. Фіг. 23В - стовпчаста діаграма, що показує середню масу живих личинок *S. littoralis* після годування протягом п'яти діб обробленими молекулою тригера dsRNA АТ-Фази віком 88 діб і контрольними (ЕДТА) рослинами томата.

40 Фіг. 24А-В: Фіг. 24А - стовпчаста діаграма, що показує середню масу личинок *S. littoralis* після годування протягом чотирьох діб обробленими молекулою тригера dsRNA NADPH віком 95 діб і контрольними (ЕДТА) рослинами томата. Фіг. 24В - стовпчаста діаграма, що показує середню масу личинок *S. littoralis* після годування протягом семи діб обробленими молекулою тригера dsRNA NADPH віком 95 доби і контрольними (ARF8) рослинами томата.

45 Фіг. 25А-Е: Фіг. 25А і С - стовпчасті діаграми, що показують відсоток мертвих личинок *S. littoralis* на одну рослину через вісім і десять діб, відповідно, після годування обробленими молекулою тригера dsRNA (EF1 α # 1, EF1 α # 2, АТФази і NADPH) віком 31 доба і контрольними (ЕДТА і ЗФБ) рослинами кукурудзи. Фіг. 25 В і D - стовпчасті діаграми, які об'єднують дані, показані на Фіг. 25 А і С, в число обробок. Фіг. 25Е - стовпчаста діаграма, що показує середню масу живих личинок *S. littoralis* через 11 діб після годування обробленими і контрольними рослинами кукурудзи. Стовпці помилок представляють стандартне відхилення даних. Фіг. 25F - стовпчаста діаграма, що показує середню масу живих личинок *S. littoralis* після годування протягом восьми і дев'яти діб обробленими рослинами віком 32 діб і контрольними рослинами кукурудзи. Маса, визначена після восьми діб, показана темними кольорами, і маса, визначена після дев'яти діб, показана світлими кольорами. Стовпці помилок представляють стандартне відхилення даних.

55 Фіг. 26А-С - стовпчасті діаграми показують виживання личинок і масу західних кукурудзяних жуків (далі ЗКЖ), яких годували рослинами кукурудзи, що вирости з насіння, обробленого MON104454 в кількості 0 частин на мільйон (контроль), 50 частин на мільйон або 500 частин на мільйон або трансгенними рослинами кукурудзи, які експресують конструкт пригнічення РНК проти Snf7 ЗКЖ (позитивний контроль). Фіг. 26А - стовпчаста діаграма, що показує відсоток виживання личинок через 4 тижні. Фіг. 26В - стовпчаста діаграма, що показує сукупну масу

личинки ЗКЖ, вижили через 4 тижні. Фіг. 26С - стовпчаста діаграма, що показує середню масу личинок ЗКЖ, вижили через 4 тижні.

Фіг. 27А-С - стовпчасті діаграми, що показують результати аналізу інвазії колорадського жука (далі КЖ) на рослини томата, які вирости з насіння, оброблених Т6593, буфером ("композиція") або молекулою тригера dsRNA ЗФБ. На Фіг. 27А показано середнє знищення листя колорадськими жуками на рослинах томата, оброблених Т6593 і контрольних (композиція і ЗФБ). На Фіг. 27В показаний відсоток личинок КЖ, які вижили. На Фіг. 27С показана середня маса личинок ЗКЖ, які вижили на оброблених рослинах.

Фіг. 28А-В: на Фіг. 28 показані результати аналізу QuantiGene рослин, оброблених ToGMoV після насичення насінини полінуклеотидними послідовностями dsRNA. На Фіг. 28А показані результати після обробки полінуклеотидом 5'AC1 dsRNA в порівнянні з контрольними (NTTrC), обробленими GUS. На Фіг. 28В показані результати після обробки полінуклеотидом 3'AC1 dsRNA в порівнянні з контрольними (NTTrC), обробленими GUS.

Фіг. 29А-В: на Фіг. 29 показані результати аналізу QuantiGene рослин, оброблених вірусом мозаїки огірка (CMV) після насичення насінини полінуклеотидними послідовностями dsRNA. На Фіг. 29А показані результати після обробки полінуклеотидом 5'NC dsRNA в порівнянні з контрольними (NTTrC), обробленими GUS. На Фіг. 29В показані результати після обробки полінуклеотидом 3'NC dsRNA порівняно з контрольними (NTTrC), обробленими GUS.

На Фіг. 30 показані результати аналізу QuantiGene рослин, оброблених вірусом плямистого в'янення томата (TSWV) полінуклеотидної послідовності 3'N dsRNA в порівнянні з контрольними (NTTrC), обробленими GUS.

На Фіг. 31А-В показана гомологія між геномом EF1α *Spodoptera littoralis*, який використаний для обробки насінини, і геномом кукурудзи. Фіг. 31А - ген EF1α, послідовність 1 з 75%-ю ідентичністю на 400 нуклеотидах. Фіг. 31В - ген EF1α, послідовність 2 з 75%-ю ідентичністю на 446 нуклеотидах. "Query" позначає послідовності *S. littoralis*, і "Subject" позначає послідовності кукурудзи.

Фіг. 32А-С - стовпчасті діаграми, що показують аналізи ПЛР в реальному часу експресії мРНК (матрична рибонуклеїнова кислота, далі мРНК) гена EF1α кукурудзи в рослинах кукурудзи віком 20 діб і 48 діб, що вирости з насіння, обробленого 50 мкг/мл dsRNA протягом 4 годин. На Фіг. 32А показана кратна зміна в експресії мРНК гена EF1α кукурудзи після обробки dsRNA гена EF1α *S. littoralis*, для якого обробка dsRNA ЗФБ була використана в якості контрольного базового рівня. Значення експресії для окремих рослин були нормалізовані до середньої експресії всіх рослин, оброблених dsRNA ЗФБ. Різниця в експресії в порівнянні з контрольною групою мала р-значення 0,016. На Фіг. 32В показано кратна зміна в експресії мРНК гена EF1α кукурудзи після обробки сумішшю тих же dsRNA, що і на Фіг. 32А, і ПЕГ-модифікованими вуглецевими нанотрубками (PMBH). Значення експресії для окремих рослин були нормалізовані до середньої експресії всіх рослин, оброблених dsRNA/ПМБН ЗФБ. Різниця в експресії в порівнянні з контрольною групою мала р-значення 0,003. На Фіг. 32С показана кратна зміна в тих же рослинах кукурудзи через 48 діб після обробки насінини. Значення експресії для окремих рослин були нормалізовані до середньої експресії всіх рослин, оброблених dsRNA/ПМБН ЗФБ. Різниця в експресії в порівнянні з контрольною групою мала р-значення 0,07.

Фіг. 33 - стовпчаста діаграма, що показує аналіз шляхом ПЛР в реальному часу експресії мРНК гена EF1α кукурудзи в рослинах кукурудзи віком дев'ять тижнів, які проросли з насіння, обробленого 132 мкг/мл dsRNA, отриманої з послідовності *S. littoralis*. Значення експресії для окремих рослин були нормалізовані до середньої експресії всіх контрольних рослин. Різниця в експресії в порівнянні з контрольною групою мала р-значення 0,12.

Фіг. 34А-В - стовпчасті діаграми, що показують аналізи шляхом ПЛР в реальному часі рослин кукурудзи віком шість діб, які проросли з насіння, обробленого 160 мкг/мл dsRNA протягом 7 годин. На Фіг. 34А показана кратна зміна в експресії мРНК гена EF1α кукурудзи по відношенню до обробки GUS dsRNA. На Фіг. 34В показана середня кратна зміна в експресії мРНК гена EF1α кукурудзи для всіх рослин, оброблених DsRNA EF1α (dsRNA # 1 і # 2, з ПМБН і без них), GUS dsRNA (з ПМБН і без них) і ЕДТА (з ПМБН і без них). Столпці помилок представляють стандартне відхилення даних.

Фіг. 35А-С - стовпчасті діаграми, що показують аналізи шляхом ПЛР в реальному часі експресії мРНК АТФази і NADPH кукурудзи в рослинах кукурудзи віком 27 діб, які проросли з насіння, обробленого 160 мкг/мл dsRNA протягом 2 годин. На Фіг. 35А показана середня кратна зміна в експресії мРНК АТФази кукурудзи. На Фіг. 35В і 35С показана середня кратна зміна в експресії мРНК NADPH. Значення експресії були нормалізовані до середньої експресії рослин, оброблених dsRNA ЗФБ (Фіг. 35А і 35В), або до середньої експресії оброблених ЕДТА контрольних рослин (Фіг. 35С). Столпці помилок представляють стандартне відхилення даних.

Докладний опис

Якщо не вказано інше, нуклеїноокислотні послідовності вказані в тексті даного опису винаходу для читання зліва направо, тобто в напрямку від 5'-кінця до 3'-кінця. Нуклеїноокислотні послідовності можуть бути представлені як ДНК (дезоксирибонуклеїнова кислота, далі ДНК) або як РНК (рибонуклеїнова кислота, далі РНК), як зазначено; розкриття однієї обов'язково визначає іншу, як відомо середньому фахівцеві в даній галузі техніки. Крім того, розкриття нуклеїноокислотної послідовності розкриває послідовність її зворотного комплементу, оскільки одна обов'язково визначає іншу, як відомо середньому фахівцю в даній області техніки. Там, де термін має єдине число, автори винаходу також передбачають аспекти винаходу, які описані цим терміном в множині.

Перед тим, як докладно пояснити варіанти здійснення винаходу, слід сказати, що винахід необов'язково обмежений у його застосуванні деталями, зазначеними в подальшому описі або в Прикладах. Винахід може мати інші варіанти здійснення або бути здійсненим на практиці різними способами.

При зростаючій кількості населення світу і обмежених площах для росту і культивування рослин існує нагальна необхідність в покращенні врожайності рослин в цих умовах, що змінюються. РНК-інтерференція (далі РНКі або RNAi) виникла як потужний інструмент для модуляції експресії генів, яка може бути використана для отримання рослин з підвищеною стійкістю до стресу. У рослинах RNAi зазвичай виконують шляхом отримання трансгенних рослин, які включають фрагмент ДНК, що транскрибований для отримання дволанцюгової РНК (далі dsРНК або dsRNA). Цю dsRNA потім процесують в малі інтерферуючі РНК (далі miРНК або siRNA), які опосередковують сайленсінг генів-мішеней, зазвичай шляхом відщеплення гена-мішені РНК-індукованим сайленсінг-комплексом (далі РНК-індукований сайленсінг-комплекс або RISC) або шляхом трансляційного пригнічення. Головне технічне обмеження цієї технології полягає в тому, що багато важливих видів сільськогосподарських культур важко або неможливо трансформувати, що виключає конститутивну експресію конструктів, направляючих продукцію dsRNA. Більше того, питання, що стосуються потенційного впливу стійких до вірусів трансгенних рослин на екологію, досі значно обмежують їх використання (Тепфер (Tepfer), 2002, Annu. Rev. Phytopathol. 40, 467-491).

Представлені варіанти здійснення включають способи введення молекул екзогенних нетранскрибованих полінуклеотидних тригерів, наприклад dsRNA, в насіння рослин для модуляції експресії генів в рослині, вирощеній з насінини, та/або в фітопатичний організм, який живиться рослиною або інфікує рослину, вирощену з обробленої насінини. Кілька варіантів здійснення відносяться до способів введення екзогенного нетранскрибованого полінуклеотидного тригера в насіння рослин для управління інвазією комах-шкідників та/або вірусною інфекцією рослин, вирощених з насіння. Засвоєння рослинного матеріалу, отриманого з насіння, обробленого молекулами екзогенного нетранскрибованого полінуклеотидного тригера, наприклад dsRNA, згідно з поданими варіантам здійснення призводить до припинення харчування, росту, розвитку, відтворення, інвазійної здібності і, в кінцевому результаті, може призвести до смерті фітопатогена. У деяких варіантах здійснення екзогенні нетранскрибовані полінуклеотидні тригери призначені для сайленсінгу гена-мішені комах-шкідників або вірусного патогена. Полінуклеотидними тригерами можуть бути одно- або дволанцюгові РНК, або одно- або дволанцюгові ДНК або гібриди дволанцюгових ДНК/РНК, або їх модифіковані аналоги, і вони можуть мати довжину олігонуклеотидів або більше. Кілька варіантів здійснення відносяться до способів введення dsRNA в насіння рослин для модуляції експресії генів.

Автори винаходу розробили нову технологію введення екзогенного нетранскрибованого полінуклеотидного тригера, наприклад, молекул dsRNA, прямо в насінину рослини. Молекули цих нетранскрибованих полінуклеотидних тригерів, наприклад, dsRNA, входять в насіння і починають процес сайленсінгу, який триває протягом всього життя рослини, приводячи до отримання рослини з поліпшеною цільовою характеристикою. Вводяться полінуклеотидні тригери голі й, таким чином, в рослину не потрапляють екзогенні елементи регулювання транскрипції, таким чином зменшуючи проблеми довкілля, пов'язані з трансгенними рослинами. У деяких варіантах здійснення полінуклеотидним тригером, який вводиться, є гола dsRNA, і, таким чином, в рослину не потрапляють екзогенні елементи регуляції транскрипції. Крім цього, модифікована насінина може бути пророщена для отримання рослини без необхідності в трудомістких і складних етапах регенерації культури тканини.

Представлені варіанти здійснення пропонують, в їх частині, систему доставки агентів боротьби зі шкідниками до шкідників за допомогою пропозиції їм раціону, що містить рослинний матеріал з насіння, обробленого цими молекулами екзогенного нетранскрибованого полінуклеотидного тригера, наприклад dsRNA, відповідно до представлених варіантів

здійснення.

Як показано нижче і в розділі "Приклади", нижче, представлені варіанти здійснення включають створення умов, необхідних для введення екзогенного нетранскрибованого полінуклеотидного тригера, наприклад, голих dsRNA, в насіння (див., наприклад, Приклад 1). Ці молекули екзогенного нетранскрибованого полінуклеотидного тригера, наприклад, гола dsRNA, що не інтегруються в геном і мають високу стійкість як в рослині, так і в розчині (див. Приклади 2 - 4). Молекули екзогенного нетранскрибованого полінуклеотидного тригера, наприклад, голої dsRNA, проникають через оболонку насінини (шкірку) однодольних і дводольних рослин і поширюються в ендоспермі і зародку насінини (Приклади 5 - 6). В одному аспекті, представлені варіанти здійснення включають зміну експресії ендеогенних генів (Приклади 8 - 15). У деяких варіантах здійснення ендеогенний ген, чия експресія змінюється, є ортологом гена-мішені шкідника. У ще одному аспекті, представлені варіанти здійснення включають введення в насіння екзогенного нетранскрибованого полінуклеотидного тригера, наприклад, dsRNA, направлених на екзогенні гени (наприклад, гени комах-шкідників або гени вірусів). Ці результати відтворені на ряді рослин однодольних і дводольних груп. У ще одному аспекті, представлені варіанти здійснення включають введення в насіння екзогенного нетранскрибованого полінуклеотидного тригера, наприклад, dsRNA, направлених на істотні гени комах-шкідників або вірусних патогенів в широкому діапазоні доз і кінетики, що призводить до значної зміни експресії генів. Що цікаво, dsRNA, введена відповідно до представлених варіантів здійснення, здатна знижувати активність істотних генів у фітопатогенні, який живиться рослиною або інфікує рослину, вирощену з обробленої насінини (наприклад, *Spodoptera littoralis*, Приклад 7). Таким чином, даних результатів достатньо для того, щоб показати, що даний опис пропонує економічну обробку насіння рослин, щоб досягти бажаного сільськогосподарського та садівничого фенотипу, такого як стійкість до комах-шкідників і вірусних патогенів.

У даному документі запропоновані композиції і способи індукції системної регуляції (наприклад, системного пригнічення або сайленсінгу) гена-мішені в рослині або фітопатогенні шляхом застосування до насінини рослини молекули полінуклеотидного тригера з сегментом в нуклеотидній послідовності, який по суті ідентичний або по суті комплементарний до послідовності з 18 або більше суміжних нуклеотидів або в гені-мішені, або в РНК, транскрибованої з гена-мішені, в результаті чого композиція проникає всередину насінини рослини і індуктує системну регуляцію гена-мішені в рослині, вирощеної з насінини, або в фітопатогені рослини, вирощеної з насінини. Молекула полінуклеотидного тригера може бути однією або декількома молекулами полінуклеотидів з одним таким сегментом, декількома такими сегментами, кількома різними такими сегментами або їх поєднанням.

Без прив'язки до конкретної теорії, можна припустити, що заново запропонована модальність трансформації і модуляція експресії генів пов'язані з:

(i) введенням молекули екзогенного нетранскрибованого полінуклеотидного тригера, наприклад, голою dsRNA, всередину насіння (на противагу простому покриттю насінини). Введення здійснюють шляхом замочування насіння в розчині, який включає ці молекули екзогенного нетранскрибованого полінуклеотидного тригера, наприклад, dsRNA, так що молекули екзогенного нетранскрибованого полінуклеотидного тригера проникають через оболонку насінини, або шляхом занурення, так що ці молекули екзогенного нетранскрибованого полінуклеотидного тригера покривають насінину і проникають через оболонку після посіву;

(ii) ампліфікацією сигналу, що генерується молекулами екзогенного нетранскрибованого полінуклеотидного тригера, наприклад, dsRNA; і

(iii) поширенням цього сигналу по рослині.

Перший етап відбувається тільки один раз, під час і незабаром після початкової обробки насінини, тоді як другий і третій етапи відбуваються в циклі, що повторюється, поки сигнал сайленсінгу залишається активним у рослині.

Без прив'язки до теорії, запропонований незв'язуючий режим дії для цього винаходу ґрунтується на кожному етапі.

Введення молекули екзогенного нетранскрибованого полінуклеотидного тригера, наприклад, dsRNA, в насіння.

Типова зріла насінина складається з зародка, одягненого в материнську оболонку насінини (шкірку) і рясний шар тканини ендосперму між зародком і оболонкою насінини. Ендосперм служить в якості джерела поживних речовин для зародка під час розвитку насіння, його проростання і виникнення паростка.

Проростання насінини зазвичай починається з впливу води на насіння, яка вбирається зародком і ендоспермом. Потім ендосперм збільшується в об'ємі, причому ендосперм деяких видів рослин здатний вирости до декількох первинних об'ємів. Зародок, який до цієї стадії

знаходиться в стані спокою, тепер виходить зі стану спокою, і починається поділ, збільшення і диференціація клітин. Ендосперм живить зародок, що розвивається, до тих пір, поки останній достатньо не розвинеться, щоб почати фотосинтез і автотрофний ріст.

На підставі цих відомих механізмів проростання насінини передбачаються два можливих режими дії для початкового етапу "введення молекул екзогенного нетранскрибованого полінуклеотидного тригера, наприклад, dsRNA, в насіння".

Ці молекули екзогенного нетранскрибованого полінуклеотидного тригера, наприклад, dsRNA, надходять безпосередньо в зародок з водним розчином, який використовується для обробки насінини.

Молекули екзогенного нетранскрибованого полінуклеотидного тригера, наприклад, dsRNA, входять в ендосперм як частина процесу вбирання води ендоспермом. Потім ці молекули живлять зародок, коли він розвивається, як частина потоку поживних речовин з ендосперму під час проростання і розвитку насінини.

Грунтуючись на результатах, показаних на Фіг. 7 - 13, можна зробити висновок, що має місце поєднання двох варіантів. Тобто, деякі dsRNA надходять безпосередньо в зародок, і деякі утримуються в ендоспермі і живлять зародок, що розвивається, під час проростання насінини.

Ампліфікація сигналу

Коли молекули dsRNA надходять в зародок, вони розпізнаються і обробляються ферментами, подібними РНКзі III (рибонуклеаза III, далі РНКза III), такими як Dicer або Dicer-подібні (далі DCL). Ферменти DCL процесують довгі молекули dsRNA на короткі, дволанцюгові РНК (відомі як siRNA або shRNA (короткі РНК, які утворюють шпильки)) (далі siRNA або shRNA), які зазвичай мають у довжину 21 - 24 нуклеотиду (нт). Один з ланцюгів siRNA зазвичай швидко деградує, і другий може бути включений в білкові комплекси RISC (далі РНК-індукований сайленсінг-комплекс або RISC), які містять білок Argonaute (AGO). Білки AGO містять домен PIWI для зв'язування siRNA і домен PAZ з РНАзною активністю. Потім комплекс siRNA/AGO ідентифікує молекулу мРНК (матрична рибонуклеїнова кислота, далі мРНК), яка комплементарна до siRNA і викликає її сайленсінг шляхом відщеплення або пригнічення трансляції.

Потім siRNA вивільняється з комплексу RISC і може діяти в якості праймера для РНК-залежної РНК-полімерази (далі РЗПП або RDRP), що є ферментом, унікальним для царства рослин, і може генерувати ампліфікацію сигналу сайленсінгу шляхом отримання нових молекул dsRNA (вторинна siRNA). Ці знову синтезовані dsRNA знову можуть бути процесовані як сказано вище, цим зберігаючи і ампліфікуючи сигнал сайленсінгу.

Поширення сигналу сайленсінгу

Поширення сайленсінгу є відомим і добре зрозумілим феноменом в рослинах. Без прив'язки до конкретної теорії, можна вважати, що поширення від клітини до клітини на коротку відстань відбувається через плазмодесми. Вважається, що цей процес опосередковує siRNA довжиною 21 нт, яка є продуктом ферменту DCL. Крім цього, системне поширення відбувається через флоему по всій рослині від джерела до стоку.

Без прив'язки до конкретної теорії, можна припустити, що в описуваній методології поширення сигналу сайленсінгу відбувається з моменту початку сигналу сайленсінгу і його ампліфікації, як сказано вище. Це може включати як поширення на коротку відстань, так і системне поширення різними сигнальними молекулами siRNA.

Відповідно до одного варіанту здійснення, запропонований спосіб введення молекули екзогенного нетранскрибованого полінуклеотидного тригера, наприклад, голою дволанцюговою РНК (dsRNA), в насінину, причому спосіб включає контакт насінини з молекулами екзогенного нетранскрибованого полінуклеотидного тригера, наприклад, голою dsRNA, в умовах, які дозволяють проникнення молекул екзогенного нетранскрибованого полінуклеотидного тригера, наприклад, голою dsRNA, в насіннину, тим самим вводячи dsRNA в насінину.

Кілька варіантів здійснення, описаних у даному документі, відносяться до способу отримання рослини, що має бажаний фенотип, причому спосіб включає: а) контакт непророслої насінини з молекулою екзогенного нетранскрибованого полінуклеотидного тригера в умовах, які дозволяють такій молекулі тригера проникати в насінину, і b) пророщування згаданої насінини для отримання рослини, що має бажаний фенотип після появи зі згаданої насінини. У деяких варіантах здійснення бажаним фенотипом є стійкість до комах. У деяких варіантах здійснення бажаним фенотипом є стійкість до вірусів.

Використовуваний в даному документі термін "тригер" або "критичний полінуклеотид" відноситься до молекули біологічно активного полінуклеотида, яка по суті гомологічна або комплементарна до полінуклеотидної послідовності гена-мішені або РНК, експресованої з гена-мішені або його фрагмента, і її функцією є пригнічення експресії гена-мішені або отримання

фенотипу нокдауну. Тригерні полінуклеотиди зазвичай описують у зв'язку з їх "послідовністю-мішенню". Тригерні полінуклеотиди можуть бути одноланцюговою ДНК (далі ssDNA), одноланцюговою РНК (далі ssRNA), дволанцюговою РНК (далі dsRNA), дволанцюговою ДНК (далі dsDNA) або гібридами дволанцюгових ДНК/РНК. Тригерні полінуклеотиди можуть

5 включати природні нуклеотиди, модифіковані нуклеотиди, аналоги нуклеотидів або будь-яке їх поєднання. У деяких варіантах здійснення тригерний полінуклеотид може бути включений в більший полінуклеотид, наприклад, в молекулу pri-miRNA (пре-мікроРНК, далі pri-miRNA). У деяких варіантах здійснення тригерний полінуклеотид може бути процесований в малу інтерферуючу РНК (siRNA).

10 Використовуваний в даному документі термін "послідовність-мішень" відноситься до нуклеотидної послідовності, яка знаходиться в гені або продукті гена, проти якого направлений тригерний полінуклеотид. У цьому контексті термін "ген" означає локалізовану ділянку геномної послідовності, що відповідає одиниці спадкування, яка включає регуляторні ділянки, такі як промотори, енхансери, нетрансльовані ділянки на 5'-кінці, інтронні ділянки, нетрансльовані

15 ділянки на 3'-кінці, транскрибовані ділянки і інші функціональні ділянки послідовності, які можуть існувати як нативні гени або трансгени в геномі рослини. Залежно від обставин, термін "послідовність-мішень" може відноситися до повнорозмірної нуклеотидної послідовності гена або продукту гена, наміченого для пригнічення, або до нуклеотидної послідовності частини гена або продукту гена, наміченого для пригнічення.

20 Використовуваний в даному документі термін "отриманий з" відноситься до певної нуклеотидної послідовності, яка може бути отримана з конкретно визначеного джерела або виду, хоча і необов'язково з такого певного джерела або виду.

Використовувані в цьому документі терміни "послідовність", "нуклеотидна послідовність" або "полінуклеотидна послідовність" відносяться до нуклеотидної послідовності молекули ДНК,

25 молекули РНК або її частини.

Термін "полінуклеотид" відноситься до будь-якого полімеру мононуклеотидів, які пов'язані міжнуклеотидними зв'язками. Полінуклеотиди можуть бути складені з природних рибонуклеотидів, природних деоксирибонуклеотидів, аналогів природних нуклеотидів (наприклад, енантіомерний форм природних нуклеотидів) або будь-якого їх поєднання. Якщо

30 полінуклеотид одноланцюговий, його довжина може бути описана як число нуклеотидів. Якщо полінуклеотид дволанцюговий, його довжина може бути описана як число пар основ.

Використовуваний в даному документі термін "нетранскрибований полінуклеотид" відноситься до полінуклеотиду, який не включає повну одиницю транскрипції полімерази II.

Термін "експресія гена" відноситься до процесу перетворення генетичної інформації, закодованої в геномній ДНК, в РНК (наприклад, мРНК (матрична рибонуклеїнова кислота, далі мРНК або mRNA), рРНК (рибосомна РНК, далі рРНК або rRNA), тРНК (транспортна РНК, далі тРНК або tRNA) або мяРНК (малі ядерні РНК, далі мяРНК або snRNA)) через транскрипцію гена за допомогою ферментативної дії РНК-полімерази і в білок через трансляцію мРНК. Експресію гена можна регулювати на багатьох стадіях процесу.

40 Використовувані в даному документі фрази "інгібування експресії гена", або "пригнічення гена", або "сайленсінг гена-мішені" і подібні їм терміни і фрази відносяться до відсутності або зниження, що спостерігається, рівня білка та/або продукту мРНК гена-мішені. Наслідки інгібування, чи пригнічення сайленсінгу можуть бути підтверджені дослідженням зовнішніх властивостей клітини або організму або біохімічними способами.

45 Використовуваний в даному документі термін "ідентичність послідовності", "схожість послідовності" або "гомологія" використовується для вказівки ступеня схожості між двома або більше нуклеотидними послідовностями. Відсоток "ідентичності послідовності" між двома послідовностями визначається шляхом порівняння двох оптимально вирівняних послідовностей у вікні порівняння, так що частина послідовності у вікні порівняння може включати додавання або делеції (пробіли) в порівнянні з контрольною послідовністю (яка не включає додавання або делеції) для оптимального вирівнювання двох послідовностей. Цей відсоток обчислюють шляхом визначення числа положень, у яких ідентична нуклеїнокіслотна основа або амінокислотний залишок присутній в обох послідовностях, щоб отримати число співпадаючих

50 положень, ділення числа співпадаючих положень на сукупне число положень у вікні порівняння і множення результату на 100, щоб отримати відсоток ідентичності послідовності. Послідовність, яка ідентична в кожному положенні з контрольною послідовністю вважається ідентичною контрольною послідовністю, і навпаки. Вирівнювання двох або більше послідовностей може бути виконано з використанням будь-якої зручної комп'ютерної програми. Наприклад, широко використовуваною і прийнятою комп'ютерною програмою для вирівнювання послідовностей є

55 CLUSTALW v1.6 (Томпсон та ін. (Thompson, et al.) Nucl. Acids Res., 22: 4673-4680, 1994).

60

Під "по суті ідентична" або "по суті комплементарна" мається на увазі, що біологічно активний полінуклеотидний тригер (або щонайменше один ланцюг двохланцюгового полінуклеотида або його частини, або частина одноланцюгового полінуклеотида) гібридується у фізіологічних умовах з ендегенним геном, транскрибованої з нього РНК або її фрагмента, щоб здійснити регуляцію або супресію цього ендегенного гена. Наприклад, у деяких варіантах здійснення біологічно активний полінуклеотидний тригер має 100% -у ідентичність послідовності або щонайменше приблизно 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 або 99% -у ідентичність послідовності при порівнянні з послідовністю з 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60 або більше суміжних нуклеотидів в гені-мішені або РНК, транскрибованої з гена-мішені. У деяких варіантах здійснення біологічно активний полінуклеотидний тригер має 100% -у комплементарність послідовності або щонайменше приблизно 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 або 99%-у комплементарність послідовності при порівнянні з послідовністю з 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60 або більше суміжних нуклеотидів в гені-мішені або РНК, транскрибованої з гена-мішені. У деяких варіантах здійснення біологічно активний полінуклеотидний тригер має 100%-у ідентичність чи комплементарність послідовності з одним алелем або одним членом сімейства даного гена-мішені (який кодує або не кодує послідовність гена). У деяких варіантах здійснення біологічно активний полінуклеотидний тригер має щонайменше приблизно 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 або 99%-у ідентичність чи комплементарність послідовності з декількома алелями або членами сімейства даного гена-мішені. У деяких варіантах здійснення біологічно активний полінуклеотидний тригер має 100%-у ідентичність чи комплементарність послідовності з декількома алелями або членами сімейства даного гена-мішені.

Вважається, що використані в даному документі молекули нуклеїноокислотних послідовностей мають "повну комплементарність", коли кожний нуклеотид однієї з послідовностей при читанні від 5'-кінця до 3'-кінця комплементарний кожному нуклеотиду іншій послідовності при читанні від 3'-кінця до 5'-кінця. Нуклеотидна послідовність, яка повністю комплементарна контрольній нуклеотидній послідовності, матиме послідовність, ідентичну зворотному комплементу контрольної нуклеотидної послідовності.

Гомологічні послідовності включають ортологічні і паралогічні послідовності. Термін "паралогічні" відноситься до ген-дуплікації в геномі виду, що призводить до паралогічних генів. Термін "ортологічний" відноситься до гомологічних генів в різних організмах через анцестральний зв'язок.

Використовувані в даному документі відносно організмів терміни "екзогенний полінуклеотид" і "молекула екзогенної нуклеїнової кислоти" відносяться до гетерологічної нуклеїноокислотної послідовності, яка не виражена природним чином в такому організмі, наприклад, в рослині. Молекула екзогенної нуклеїнової кислоти може включати нуклеїноокислотну послідовність, яка ідентична або частково гомологічна ендегенній нуклеїноокислотній послідовності організму.

Використовувані в даному документі терміни "ендогенний полінуклеотид" і "ендогенна нуклеїнова кислота" відносяться до нуклеїноокислотним послідовностей, які знаходяться в клітині організму. При певних аспектах ендегенна нуклеїнова кислота може бути частиною ядерного геному або пластидного геному. Використовувані в даному документі ендегенні нуклеїнові кислоти не включають нуклеїнові кислоти вірусів, паразитів або патогенів, наприклад, послідовність ендевіруса.

Використовувана в даному документі фраза "гола dsRNA" відноситься до молекули нуклеїнової кислоти dsRNA, яка не може бути транскрибована в клітині рослини. Таким чином, гола молекула dsRNA не включена в конструкт експресії нуклеїнової кислоти, такий як вірусний вектор. Згідно з деякими варіантами здійснення винаходу, голу молекулу dsRNA не отримують з вірусного вектора. Відповідно до деяких варіантів здійснення, dsRNA не є продуктом природної патогенної або вірусної інфекції. Відповідно до деяких варіантів здійснення, гола dsRNA може включати регуляторні елементи для транскрипції *in vitro*, такі як промотор T7. Відповідно до деяких варіантів здійснення винаходу, гола dsRNA може бути модифікована, наприклад, хімічно модифікована, щоб забезпечити підвищені біологічну доступність, здатність проникати в насіння і/або термін зберігання.

Використовуваний в даному документі термін "dsRNA" відноситься до двох ланцюгів антипаралельних полірибонуклеїнових кислот, утримуваних разом за рахунок спарювання основ. Молекула dsRNA може бути сформована внутрішньомолекулярною гібридизацією або міжмолекулярною гібридизацією. У деяких варіантах здійснення dsRNA може включати один

ланцюг РНК, яка самостійно гібридується, щоб сформувати шпилькову структуру, що має щонайменше частково дволанцюгову структуру, що включає щонайменше один сегмент, який буде гібридуватися з РНК, транскрибованої з гена, наміченого для супресії. У деяких варіантах здійснення dsRNA може включати два окремих ланцюга РНК, які гібридизуються за допомогою комплементарного спарювання основ. Ланцюги РНК можуть бути поліаденілуваними або не поліаденілуваними; ланцюги РНК можуть бути здатні або не здатні до трансляції в поліпептид трансляційним механізмом клітини. Два ланцюга можуть мати однакову або різну довжину за умови, що між ними існує гомологія послідовностей, достатня для того, щоб дволанцюгова структура була сформована з комплементарністю щонайменше 80%, 90%, 95% або 100% по всій довжині. Відповідно до одного варіанту здійснення винаходу, у молекули dsRNA немає звисаючих кінців. Відповідно до ще одного варіанту здійснення винаходу, молекула dsRNA включає звисаючі кінці. Відповідно до інших варіантів здійснення, ланцюги вирівняні так, що існують щонайменше 1, 2 або 3 основи на кінці ланцюгів, що не вирівнюються (тобто, для яких немає комплементарних основ в протилежному ланцюзі), так що звисання 1, 2 або 3 залишків має місце на одному або обох кінцях дуплексу, коли ланцюги відпалені.

Як буде зрозуміло середньому фахівцю в даній області техніки, молекула dsRNA із даного розкриття може відноситися до будь-якого ланцюга антипаралельних нуклеїнових кислот. Як також буде зрозуміло середньому фахівцю в даній області техніки, молекула dsRNA даного розкриття включає як смисловий, так і антисмисловий ланцюг, і смисловий і антисмисловий ланцюг є зворотними комплементами один одного на ділянці спарювання основ. Використовувана в даному документі послідовність молекули dsRNA для регуляції наміченого гена-мішені запропонована в смисловій орієнтації стосовно до наміченого гену-мішені. Використовувана в даному документі фраза "зворотний комплемент молекули dsRNA для регуляції наміченого гена-мішені" відноситься до нуклеїнокислотної послідовності в антисмисловій орієнтації.

Як сказано вище, будь-яку молекулу dsRNA можна використовувати у відповідності з даним розкриттям. У деяких варіантах здійснення dsRNA, використовувану в даному розкритті, піддають ампліфікації РНК-залежної РНК-полімеразою (RDRP). Говорячи без обмежень, dsRNA може бути siRNA, shRNA, pre-miRNA або pri-miRNA.

Полінуклеотиди, ДНК, РНК, dsRNA, siRNA, shRNA, pre-miRNA, pri-miRNA або miRNA в представлених варіантах здійснення можуть бути отримані хімічним або ферментативним шляхом фахівцем у даній галузі техніки за допомогою реакцій, виконуваних вручну або автоматично, або in vivo в іншому організмі. РНК також може бути отримана шляхом часткового або повного органічного синтезу; будь-який модифікований рибонуклеотид може бути введений in vitro шляхом ферментативного або органічного синтезу. РНК може бути синтезована клітинною РНК-полімеразою або РНК-полімеразою бактеріофага (наприклад, T3, T7, SP6). Викристання та продукція експресуючого конструкту відомі в даній області техніки (див., наприклад, WO 97/32016; патенти США №№ 5,593,874, 5,698,425, 5,712,135, 5,789,214 і 5,804,693). Якщо вона синтезована хімічним шляхом або ферментативним синтезом in vitro, РНК може бути очищена перед введенням в насінину. Наприклад, РНК може бути очищена від суміші шляхом екстрагування розчинником або смолою, осадження, електрофорезу, хроматографії або їх поєднання. Альтернативно, РНК може бути використана без очищення або з мінімальним очищенням, щоб уникнути втрат при обробці проби. РНК може бути висушена для зберігання або розчинена у водному розчині. Такий розчин може містити буфери або солі, щоб сприяти відпалу та/або стабілізації ланцюгів дуплексу.

Дане розкриття відноситься до dsRNA різної довжини, у зв'язку з чим більш коротка версія, тобто, коротше або рівна 50 парам основ (наприклад, 17 - 50), називається siRNA або miRNA. Більш довгі молекули dsRNA з 51 - 600 або більше ніж 600 пар основ називаються в даному документі dsRNA, які можуть бути далі процесовані в молекули siRNA.

В одному варіанті здійснення dsRNA в даній заявці має 20 - 100 пар основ, 25 - 90 пар основ, 30 - 80 пар основ, 30 - 70 пар основ, 30 - 60 пар основ або 30 - 50 пар основ. У ще одному варіанті здійснення dsRNA в цій заявці має приблизно 50 пар основ. У ще одному варіанті здійснення dsRNA включає 5'-звисаючі кінці з 1 основи, 2 основ або 3 основ на одному або обох кінцях. У ще одному варіанті здійснення dsRNA не включає 5'-звисаючі кінці з 1 основи, 2 основ або 3 основ на одному або обох кінцях. У ще одному варіанті здійснення dsRNA включає 3'-звисаючі кінці з 1 основи, 2 основ або 3 основ на одному або обох кінцях. У ще одному варіанті здійснення, dsRNA не включає 3'-звисаючі кінці з 1 основи, 2 основ або 3 основ на одному або обох кінцях.

У ще одному варіанті здійснення dsRNA в даній заявці має 100 - 1000 пар основ, 200 - 900 пар основ, 300 - 800 пар основ, 400 - 700 пар основ, 400 - 600 пар основ або 400 - 500 пар

основ. У ще одному варіанті здійснення dsRNA в даній заявці має приблизно 450 пар основ. У ще одному варіанті здійснення dsRNA в даній заявці має приблизно 550 пар основ. У ще одному варіанті здійснення dsRNA в цій заявці має приблизно 650 пар основ. У ще одному варіанті здійснення dsRNA в цій заявці має приблизно 750 пар основ. У ще одному варіанті здійснення dsRNA включає 5'-звисяючі кінці з 1 основи, 2 основ або 3 основ на одному або обох кінцях. У ще одному варіанті здійснення dsRNA не включає 5'-звисяючі кінці з 1 основи, 2 основ або 3 основ на одному або обох кінцях. У ще одному варіанті здійснення dsRNA включає 3'-звисяючі кінці з 1 основи, 2 основ або 3 основ на одному або обох кінцях. У ще одному варіанті здійснення dsRNA не включає 3'-звисяючі кінці з 1 основи, 2 основ або 3 основ на одному або обох кінцях.

В одному варіанті здійснення dsRNA в даній заявці має 15 - 500 пар основ, 15 - 450 пар основ, 15 - 400 пар основ, 15 - 350 пар основ, 15 - 300 пар основ, 15 - 250 пар основ, 15 - 200 пар основ, 15 - 150 пар основ, 15 - 100 пар основ, 15 - 90 пар основ, 15 - 80 пар основ, 15 - 70 пар основ, 15 - 60 пар основ, 15 - 50 пар основ, 15 - 40 пар основ, 15 - 35 пар основ, 15 - 30 пар основ або 15 - 25 пар основ. У ще одному варіанті здійснення dsRNA в даній заявці має довжину щонайменше приблизно 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 500, 600, 800, 900, 1000 пар основ. У ще одному варіанті здійснення dsRNA в цій заявці має 100 - 1000 пар основ, 200 - 1000 пар основ, 300 - 1000 пар основ, 400 - 1000 пар основ, 500 - 1000 пар основ, 600 - 1000 пар основ, 700 - 1000 пар основ, 800 - 1000 пар основ або 900 - 1000 пар основ.

Термін "siRNA" відноситься до дуплексів малих інгібуючих РНК (зазвичай 17 - 30 пар основ, але також довше, наприклад, 31 - 50 пар основ), які індують шлях РНК-інтерференції (RNAi). Зазвичай молекули siRNA синтезують хімічним шляхом як 21-міри з центральною дуплексною ділянкою із 19 пар основ і симетричними 3'-звисяючими кінцями з 2 основ на кінцях, хоча недавно було описано, що хімічно синтезовані дуплекси РНК довжиною 25 - 30 пар основ можуть мати 100-кратне підвищення потенції у порівнянні з 21-мірами в тому ж місці. Підвищена потенція, яка спостерігалася, отримана при використанні довших РНК при запуску RNAi, теоретично є результатом застосування ферменту Dicer з субстратом (27-міри) замість продукту (21-міри), і це підвищує швидкість або ефективність входження дуплексу siRNA в комплекс RISC.

Було встановлено, що положення 3'-звисяючого кінця впливає на потенцію siRNA, і що асиметричні дуплекси, що мають 3'-звисяючий кінець на антисмисловому ланцюгу зазвичай більш сильні ніж такі з 3'-звисяючим кінцем на смисловому ланцюзі (Rose et al. , 2005). Це може бути віднесено на рахунок завантаження асиметричного ланцюга в RISC, оскільки при націлюванні на антисмисловий транскрипт спостерігаються протилежні патерни ефективності.

Ланцюги дволанцюгової інтерферуючої РНК (наприклад, siRNA) можуть бути з'єднані, щоб сформувані структуру шпильки або стебла-петлі (наприклад, shRNA). Таким чином, згаданий агент сайленсінгу РНК в деяких варіантах здійснення винаходу також може бути короткою шпильковою РНК (shRNA).

Термін "shRNA", використовуваний в даному документі, відноситься до РНК-агенту, що має структуру стебла-петля, що включає першу і другу ділянку комплементарної послідовності, причому ступінь комплементарності і орієнтація цих ділянок достатня для того, щоб між ними відбувалося спарювання основ, при цьому перша і друга ділянки з'єднуються петлевою ділянкою, де петля є результатом відсутності спарювання основ між нуклеотидами (або аналогами нуклеотидів) в петлевій ділянці. Число нуклеотидів в петлі становить, включно, 3 - 23, або 5 - 15, або 7 - 13, або 4 - 9, або 9 - 11. Деякі з нуклеотидів в петлі можуть брати участь у взаємодії пар основ з іншими нуклеотидами в петлі. Приклади послідовностей олігонуклеотидів, які можуть бути використані для формування петлі, включають 5'-UUCAAGAGA-3' (Brummelkamp, TR et al. (2002) Science 296: 550) і 5'-UUUGUGUAG-3' (Castanotto, D. et al. (2002) RNA 8: 1454). Фахівець у даній галузі техніки зрозуміє, що одноланцюговий олігонуклеотид, що отримується, формує структуру стебла-петлі або шпильки, що включає дволанцюгову ділянку, здатну взаємодіяти з механізмом RNAi.

Використовувана в даному документі фраза "мікроРНК (також згадувана як взаємозамінні "miRNA" або "miR") або її прекурсор" відноситься до молекули мікроРНК (miRNA), діючої як посттранскрипційний регулятор. Зазвичай молекулами miRNA є молекули РНК довжиною приблизно 20 - 22 нуклеотидів, які можуть бути завантажені в комплекс RISC і які направляють відщеплення іншої молекули РНК, причому така інша молекула РНК включає нуклеотидну послідовність, по суті комплементарну до нуклеотидної послідовності молекули miRNA.

Зазвичай молекулу miRNA процесують з "pre-miRNA" або, як використовується в даному документі, з прекурсора молекули pre-miRNA білками, такими як білки DCL, присутнього в клітці

рослини і завантажуваного в комплекс RISC, де вона може направляти відщеплення молекул-мішеней РНК.

Молекули pre-miRNA зазвичай процесують з молекул pri-miRNA (первинних транскриптів). Одноланцюгові сегменти РНК, які фланкують pre-miRNA, важливі для процесингу pri-miRNA в pre-miRNA. Представляється, що сайт відщеплення визначається відстанню від стику стеблів-ssRNA (одноланцюгова РНК, далі ssRNA) (Han et al. 2006, Cell 125, 887-901, 887-901).

Використовуваний в даному документі термін "молекула pre-miRNA" відноситься до молекули РНК з приблизно 100 - 200 нуклеотидів, переважно приблизно 100 - 130 нуклеотидів, які можуть приймати вторинну структуру, що включає недосконале стебло дволанцюгової РНК і петлю одноланцюгової РНК, (також називається "шпилькою") і крім цього включає нуклеотидну послідовність miRNA (і послідовність її комплементу) в стеблі дволанцюгової РНК. Відповідно до одного специфічного варіанту здійснення, miRNA і її комплемент розташовані приблизно на відстані 10 - 20 нуклеотидів від вільних кінців стебла miRNA дволанцюгової РНК. Довжина і послідовність одноланцюгової петлевої ділянки критичними не є і можуть значно змінюватися, наприклад, 30 - 50 нуклеотидів по довжині. Комплементарність між miRNA і її комплементом необов'язково повинна бути досконалою, і можуть бути допустимими приблизно 1 - 3 петлі неспарених нуклеотидів. Вторинна структура, яка приймається молекулою РНК, може бути спрогнозована з використанням комп'ютерних алгоритмів, відомих у цій галузі, наприклад mFOLD. Конкретний ланцюг дволанцюгового стебла РНК з pre-miRNA, яка вивільняється за рахунок активності білка DCL і завантажуються в комплекс RISC, визначається ступенем комплементарності на 5'-кінці, у зв'язку з чим ланцюг, який на її 5'-кінці найменш бере участь у водневих зв'язках між нуклеотидами різних ланцюгів стебла dsRNA, яку відщеплювали, завантажуються в комплекс RISC і визначатиме специфічність послідовності деградації молекули-мішені РНК. Однак, якщо емпірично молекула miRNA з конкретної синтетичної молекули pre-miRNA не функціональна (оскільки в комплекс RISC завантажений "неправильний" ланцюг), буде відразу ж очевидно, що цю проблему можна вирішити шляхом заміни положення молекули miRNA і її комплементу на відповідних ланцюгах стебла dsRNA молекули pre-miRNA. Як відомо в даній області, зв'язування між А і U, які включають два водневих зв'язки, або G і U, включає два водневих зв'язки, менш сильне ніж між G і C, які включають три водневих зв'язки. Приклади шпилькових послідовностей представлені в Таблицях 3, 4, 6, 7, 13, 18, 26, 27, 28, 34, 35, 36 і 37, нижче.

Молекули природної miRNA можуть міститися в їх природних молекулах pre-miRNA, але вони також можуть бути введені в скелети існуючих молекул pre-miRNA шляхом заміни нуклеотидної послідовності молекули miRNA, яка нормально процесує з такої існуючої молекули pre-miRNA, на нуклеотидну послідовність іншої miRNA, яка представляє інтерес. Скелет pre-miRNA також може бути повністю синтетичним. Подібно цьому, молекули синтетичної miRNA можуть міститися в скелетах молекул існуючої pre-miRNA або скелетах молекул синтетичної pre-miRNA і бути процесованими з них. Деякі скелети pre-miRNA можуть бути переважними ніж інші через ефективності їх правильного процесингу в намічену мікроРНК, особливо при експресії як химерний ген, в якому інші ділянки ДНК, такі як нетрансльовані лідерні послідовності або ділянки термінації транскрипції і поліаденілювання, включені в первинний транскрипт на додаток до pre-miRNA.

Відповідно до даного розкриття, молекули dsRNA можуть бути природними або синтетичними.

DsRNA може бути сумішшю довгих і коротких молекул dsRNA, таких як dsRNA, siRNA, siRNA + dsRNA, siRNA + miRNA або бути їх комбінацією. Відповідно до одного специфічного варіанту здійснення, dsRNA є siRNA (100%). Відповідно до одного специфічного варіанту здійснення dsRNA є комбінацією siRNA + dsRNA в різних співвідношеннях. Будь-яке співвідношення dsRNA/siRNA можна використовувати для комбінації siRNA + dsRNA. Наприклад, співвідношення 1: 1 - одна dsRNA змішана з такою ж послідовністю після обробки РНКазою III. Відповідно до ще одного варіанту здійснення, співвідношення dsRNA/siRNA становить 2:1, 1,5:1, 1,3:1, 1:0,01, 1:0,05 або 1:0,1. Відповідно до ще одного варіанту здійснення, співвідношення dsRNA/siRNA становить 2:1 - 1:0,1. Відповідно до одного специфічного варіанту здійснення, dsRNA є очищеною dsRNA (100%). Відповідно до ще одного варіанту здійснення співвідношення dsRNA/siRNA становить 1: 2, 1:5, 1:10, 1:20 або 1:50. Відповідно до ще одного варіанту здійснення dsRNA є очищеною siRNA (100%).

Молекулу dsRNA можна розробити для специфічного націлювання на ген-мішень, що представляє інтерес. У деяких варіантах здійснення ген-мішень є істотним геном комахи-шкідника. У деяких варіантах здійснення ген-мішень є геном вірусу. Слід розуміти, що dsRNA можна використовувати для зниження активності одного або декількох генів-мішеней. Якщо

намічено деяку кількість генів-мішеней, використовують гетерогенну композицію, яка включає деяку кількість молекул dsRNA для цієї кількості генів-мішеней. Альтернативно, згадані кілька молекул dsRNA окремо застосовують до насіння (але не як композицію). Відповідно до одного специфічного варіанту здійснення, використовують деяку кількість окремих молекул dsRNA для однієї мішені, які можуть бути застосовані окремо або одночасно (наприклад, в одній композиції).

Відповідно до одного варіанту здійснення, ген-мішень є ендегенним для рослини. Зниження активності такого гена зазвичай важливо для додання рослині поліпшених сільськогосподарських, садівничих, поживних характеристик (визначення "поліпшення" або "збільшення" наведені нижче). Слід розуміти, що обробка за допомогою dsRNA може призводити до підвищення активності гена-мішені (яка слідує до запропонованого механізму, представленому нижче), але таке підвищення активності може бути короточасним.

Відповідно до ще одного варіанту здійснення, ген-мішень є екзогенним для рослини. У деяких варіантах здійснення ген-мішень є геном комахи-шкідника. У деяких варіантах здійснення ген-мішень є геном вірусу. Також слід розуміти, що обробка за допомогою dsRNA може призводити до підвищення активності гена-мішені, ортологічного рослині.

Кілька варіантів здійснення, описаних у даному документі, відносяться до інструкцій з конструювання та вибору молекул нетранскрибованого полінуклеотидного тригера, наприклад dsRNA, молекул для ефективного сайленсінгу РНК в фітопатогенів, які живляться рослиною або залежать від рослини при рості/реплікації і/або виживанні. Без прив'язки до конкретної теорії, ці молекули нетранскрибованого полінуклеотидного тригера, наприклад, dsRNA, що мають достатній рівень гомології з ендегенним геном рослини, дозволяють деградацію і ампліфікацію первинних siRNA (тих, які запуснені процесингом за допомогою ферменту Dicer), щоб генерувати вторинні siRNA, сформовані ферментом DICER-LIKE 4 (Dicer-подібний) (DCL4). Так, ці молекули нетранскрибованого полінуклеотидного тригера, наприклад, dsRNA, можуть бути обрані за отриманням мінімального впливу на ріст і життєздатність рослини. У деяких варіантах здійснення вторинні siRNA мають достатню гомологію з геном фітопатогену для того, щоб дозволити деградацію гена-мішені фітопатогену за допомогою РНК-інтерференції. У деяких варіантах здійснення фітопатоген, забезпечений матеріалом рослини, вирощеної з насінини, обробленої цими молекулами нетранскрибованого полінуклеотидного тригера, наприклад dsRNA, який описаний в даному документі, втрачає життєздатність шляхом індукування припинення росту або смерті. Так що молекули нетранскрибованого полінуклеотидного тригера, наприклад, молекули dsRNA, вважаються цінними пестицидами і можуть знаходити широке застосування в сільському господарстві та садівництві.

Без прив'язки до конкретної теорії, припущено, що один режим модуляції експресії гена пов'язаний з: (i) введенням молекул нетранскрибованого полінуклеотидного тригера, наприклад, dsRNA, всередину насіння (на противагу простому покриттю насінини); (ii) ампліфікацією сигналу, створюваного шляхом введення молекули нетранскрибованого полінуклеотидного тригера, наприклад, dsRNA; і поширенням цього сигналу по рослині. Перший етап має місце тільки один раз, під час і незадовго після початкової обробки насінини, тоді як другий і третій етапи відбуваються як повторюваний цикл, поки сигнал сайленсінгу залишається активним у рослині. Як було сказано, введення композицій цього винаходу також може бути виконано для інших органів/клітин рослини (на противагу до насіння) з використанням відомих способів доставки, таких як бомбардування частинками, щеплення, замочування, топікальне застосування з передавальним агентом і т.д. Таким чином, у вищевказані етапи (i) і (ii) також включено даний режим застосування.

Поїдання або інфікування фітопатогеном рослини, яка включає будь-яку з dsRNA, первинної siRNA або вторинної siRNA, які націлені на істотний ген фітопатогену, тягне за собою припинення росту або смерть, ніж скорочується його шкідливий вплив на рослину або продукт рослини.

У деяких варіантах здійснення запропонований спосіб введення голої дволанцюгової РНК (dsRNA) в насінину, причому спосіб включає контакт насінини з голою dsRNA в умовах, які дозволяють проникнення нуклеїноокислотної послідовності, що має рівень гомології з геном фітопатогенного організму, достатній для індукування деградації цього гена цього фітопатогенного організму, причому ріст такого фітопатогенного організму залежить від такої рослини, і причому згадана деградація індукує припинення росту або смерть такого фітопатогенного організму. У деяких варіантах здійснення dsRNA націлена на ген, який містить погано стабілізовані ділянки між окремими фітопатогенними організмами або між фітопатогенним організмом і рослиною-господарем. У певних варіантах здійснення може бути бажаним вибрати в якості мішені ген в фітопатогенному організмі, який не має відомих

гомологів в інших організмах, таких як рослина-господар.

У деяких варіантах здійснення молекулу нетранскрибованого полінуклеотидного тригера, наприклад, dsRNA, вибирають так, щоб вона мала достатню гомологію з геном рослини для того, щоб опосередкувати її деградацію у функції, опосередкованої РНК-інтерференцією.

Відповідно до одного варіанту здійснення, запропонований спосіб введення голої дволанцюгової РНК (dsRNA) в насінину, причому спосіб включає контакт насінини з голою dsRNA в умовах, які дозволяють проникнення нуклеїнокислотної послідовності, що має:

(i) рівень гомології з геном рослин, достатній для індукування ампліфікації вторинної siRNA-продуктів згаданої dsRNA в клітці рослини, що включає цей ген, і причому модифікація експресії гена рослини згаданої dsRNA несуттєво впливає на біомасу, силу або врожайність такої рослини; і

(ii) рівень гомології з геном фітопатогенного організму, достатній для індукування деградації такого гена такого фітопатогенного організму, причому ріст фітопатогенного організму залежить від такої рослини, і причому згадана деградація індукуює припинення росту або смерть фітопатогенного організму.

У деяких варіантах здійснення dsRNA має рівень гомології з геном рослини, достатній для індукування ампліфікації вторинної siRNA-продуктів згаданої dsRNA в клітині рослини, що включає dsRNA, і причому зміна експресії гена рослини згаданої dsRNA несуттєво впливає на біомасу, силу або врожайність такої рослини. Ген рослини може бути експресований в рослину природним шляхом (ендогенний) або бути результатом генетичної трансформації (трансгенна рослина).

У деяких варіантах здійснення dsRNA має рівень гомології з геном рослини, який:

(i) експресується у всіх або в більшості органів рослини, починаючи з проростання;

(ii) є несуттєвим геном, так що зниження або підвищення його активності не впливає на будь-яке з біомаси, врожайності, життєвої сили рослини; та / або

(iii) не пов'язаний з існуванням абіотичного або біотичного стресу.

Може бути обраний ген рослини, що має щонайменше одну з вищенаведених характеристик, тобто, (i), (ii) або (iii). Альтернативно, ген рослини задовольняє двом критеріям, таким як (i) і (ii), (i) і (iii) або (ii) і (iii). Альтернативно, превалюють всі три критерії, тобто, (i), (ii) і (iii). У деяких варіантах здійснення dsRNA має рівень гомології з геном рослини, який не впливає на біомасу, врожайність і/або життєву силу рослини, коли вживаються заходи для вирощування рослини в оптимальних/нормальних умовах чи в умовах, які не вимагають функціонування гена для оптимального росту, життєвої сили, біомаси та/або врожайності. Використовувана в даному документі фраза "несуттєво впливає" відноситься до відсутності впливу в порівнянні з цією ж характеристикою в ізогенній рослині на тій же стадії розвитку і в тих же умовах росту. Альтернативно, вплив на згадану характеристику слабкий, наприклад, не більше ніж 10%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% або 1%.

Відповідно до деяких варіантів здійснення, нуклеїнокислотну послідовність молекули нетранскрибованого полінуклеотидного тригера, наприклад, dsRNA, вибирають так, щоб проявити достатню гомологію для рекрутування системи RDR6 і створити транскрипти вторинної siRNA. Такий рівень гомології зазвичай має щонайменше 80%-ву ідентичність з ендегенним геном рослини щонайменше на 25 послідовних парах основ. Відповідно до одного альтернативного варіанту здійснення, рівень гомології цієї молекули нетранскрибованого полінуклеотидного тригера, наприклад, dsRNA, має щонайменше 85% -у ідентичність з геном рослини щонайменше на 25 послідовних парах основ. Відповідно до одного альтернативного варіанту здійснення, рівень гомології цієї молекули нетранскрибованого полінуклеотидного тригера, наприклад, dsRNA, має щонайменше 88%-у ідентичність з геном рослини щонайменше на 25 послідовних парах основ. Відповідно до одного альтернативного варіанту здійснення, рівень гомології цієї молекули нетранскрибованого полінуклеотидного тригера, наприклад, dsRNA, має щонайменше 90% -у ідентичність з геном рослини щонайменше на 25 послідовних парах основ гена-мішені. Відповідно до одного альтернативного варіанту здійснення, рівень гомології цієї молекули нетранскрибованого полінуклеотидного тригера, наприклад, dsRNA, має щонайменше 92%-у ідентичність з геном рослини щонайменше на 25 послідовних парах основ. Відповідно до одного альтернативного варіанту здійснення, рівень гомології цієї молекули нетранскрибованого полінуклеотидного тригера, наприклад, dsRNA, має щонайменше 95%-у ідентичність з геном рослини щонайменше на 25 послідовних парах основ. Відповідно до одного альтернативного варіанту здійснення, рівень гомології цієї молекули нетранскрибованого полінуклеотидного тригера, наприклад, dsRNA, становить щонайменше 25 послідовних пар основ.

Відповідно до деяких варіантів здійснення, молекула нетранскрибованого

полінуклеотидного тригера, наприклад, dsRNA, має щонайменше 70 пар основ або більше, наприклад, 70-700, 70-600, 70-500, 70-400, 70-300, 70-200, 70-100 пар основ.

Відповідно до деяких варіантів здійснення, молекула нетранскрибованого полінуклеотидного тригера, наприклад, dsRNA, включає нуклеїно кислотний сегмент щонайменше 70 пар основ в довжину, який щонайменше на 65% ідентичний гену рослини. Відповідно до одного специфічного варіанту здійснення, нуклеїно кислотна послідовність включає нуклеїно кислотний сегмент щонайменше 70 пар основ в довжину, який щонайменше на 70% ідентичний (по всій послідовності) гену рослини. Відповідно до одного специфічного варіанту здійснення, нуклеїно кислотна послідовність включає нуклеїно кислотний сегмент щонайменше 70 пар основ в довжину, який щонайменше на 75% ідентичний (по всій послідовності) гену рослини. Відповідно до одного специфічного варіанту здійснення, нуклеїно кислотна послідовність включає нуклеїно кислотний сегмент щонайменше 70 пар основ в довжину, який щонайменше на 80% ідентичний (по всій послідовності) гену рослини. Відповідно до одного специфічного варіанту здійснення, нуклеїно кислотна послідовність включає нуклеїно кислотний сегмент щонайменше 70 пар основ в довжину, який щонайменше на 90% ідентичний (по всій послідовності) гену рослини. Відповідно до одного специфічного варіанту здійснення, нуклеїно кислотна послідовність включає нуклеїно кислотний сегмент щонайменше 70 пар основ в довжину, який щонайменше на 95% ідентичний (по всій послідовності) гену рослини. Відповідно до одного специфічного варіанту здійснення, нуклеїно кислотна послідовність включає нуклеїно кислотний сегмент щонайменше 70 пар основ в довжину, який на 100% ідентичний (по всій послідовності) гену рослини.

У деяких варіантах здійснення нуклеїно кислотна послідовність молекули нетранскрибованого полінуклеотидного тригера, наприклад, dsRNA, включає другий нуклеїно кислотний сегмент щонайменше 17 пар основ в довжину (щонайменше 17 послідовних пар основ), який щонайменше на 85% ідентичний гену рослини. Відповідно до одного специфічного варіанту здійснення, нуклеїно кислотна послідовність молекули нетранскрибованого полінуклеотидного тригера, наприклад, dsRNA, включає другу нуклеїно кислотний сегмент щонайменше 17 пар основ в довжину (щонайменше 17 послідовних пар основ), який щонайменше на 90% ідентичний гену рослини. Відповідно до одного специфічного варіанту здійснення, нуклеїно кислотна послідовність молекули нетранскрибованого полінуклеотидного тригера, наприклад, dsRNA, включає другий нуклеїно кислотний сегмент щонайменше 17 пар основ в довжину (щонайменше 17 послідовних пар основ), який щонайменше на 95% ідентичний гену рослини. Відповідно до одного специфічного варіанту здійснення, нуклеїно кислотна послідовність молекули нетранскрибованого полінуклеотидного тригера, наприклад, dsRNA, включає другий нуклеїно кислотний сегмент щонайменше 17 пар основ в довжину (щонайменше 17 послідовних пар основ), який на 100% ідентичний гену рослини.

Відповідно до одного специфічного варіанту здійснення, перший нуклеїно кислотний сегмент і другий нуклеїно кислотний сегмент перекриваються (щонайменше на 5%, 10%, 20%, 40%, 50% або більше). Відповідно до одного специфічного варіанту здійснення, перекривання становить 5 - 99%, 5 - 95%, 5 - 90%, 5 - 80%, 5 - 70%, 5 - 60%. Відповідно до одного специфічного варіанту здійснення, перший нуклеїно кислотний сегмент і другий нуклеїно кислотний сегмент не мають перекривання.

У деяких варіантах здійснення нуклеїно кислотна послідовність молекули нетранскрибованого полінуклеотидного тригера, наприклад, dsRNA, обрана як така, що має рівень гомології з геном фітопатогенного організму, достатній для індукції деградації гена фітопатогенного організму, причому зростання фітопатогенного організму залежить від рослини, і причому деградація індукції призупинення росту або смерть фітопатогенного організму.

Таким чином, молекула нетранскрибованого полінуклеотидного тригера, наприклад, dsRNA, володіє щонайменше 80%, 85%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% або навіть 100%-ю ідентичністю гену фітопатогена.

У деяких варіантах здійснення молекула нетранскрибованого полінуклеотидного тригера, наприклад, dsRNA, може бути розроблена для специфічного гена-мішені, що становить інтерес. Слід розуміти, що молекула нетранскрибованого полінуклеотидного тригера, наприклад, dsRNA, може бути використана для зниження активності одного або більше генів-мішеней фітопатогена або рослини (в останньому випадку для підвищення ампліфікації). Якщо передбачено деяке число генів-мішеней, використовується гетерогенна композиція, яка включає деяка кількість молекул нетранскрибованого полінуклеотидного тригера, наприклад,

dsRNA, для націлювання на гени-мішені. Альтернативно, кілька молекул нетранскрибованого полінуклеотидного тригера, наприклад, молекул dsRNA, наносять окремо на насіння (але не як їх композицію).

Зниження активності гена-мішені може бути важливим для надання підвищеної толерантності до біотичного стресу, який індукують фітопатогеном. Біотичний стрес може впливати на біомасу, силу або врожайність рослини, а також на толерантність до абіотичних стресів і ефективність використання азоту. Ген-мішень (рослина фітопатогена) може включати нуклеїнокислотну послідовність, яка транскрибується в мРНК, яка відповідає за властивості поліпептиду.

Використовуваний в даному документі термін "ендогенний" відноситься до гену, експресія якого (мРНК або білок) відбувається в рослині. Зазвичай ендогенний ген природним шляхом експресується в рослині або походить з рослини. Таким чином, рослиною може бути рослина дикої типу. Однак рослиною також може бути генетично модифікована рослина (трансгенна).

Використовуваний в даному документі термін "ізолюваний" відноситься до ізоляції від фізіологічного природного середовища. У випадку dsRNA - ізоляція від клітинних органел, таких як цитозоль або ядро. У випадку насінини - ізоляція від інших частин рослини, таких як плід. Відповідно до одного специфічного варіанту здійснення, ізолювана молекула dsRNA має форму голої РНК.

Зниження активності гена-мішені може бути важливо для надання поліпшеної характеристики, однією з або щонайменше однією з (наприклад, дві з або більше) наступних: біомаса, сила, врожайність, толерантність до абіотичних стресів, толерантність до біотичного стресу або підвищена ефективність використання азоту.

Приклади генів-мішеней включають, але без обмеження, фермент, структурний білок, регуляторний білок рослини, ген-мішень miRNA або некодуючої РНК, такої як miRNA рослини. У документах WO2011067745, WO 2009125401 та WO 2012056401 представлені приклади послідовності miRNA або мішеней miRNA (наприклад, miRNA167, miRNA 156, miR164 і їх мішені NFY, SPL17 і NAC, відповідно), експресія яких може бути пригнічена для поліпшення характеристик рослини. Інші приклади генів-мішеней, які можуть бути піддані модуляції відповідно до даного розкриття, описані в розділі "Приклади", нижче.

Ген-мішень може включати нуклеїнокислотну послідовність, яка транскрибується в мРНК, що відповідає за дії поліпептиду. Альтернативно, геном-мішенню може бути некодуючий ген, такий як miRNA або siRNA.

Наприклад, для пригнічення експресії мРНК, яка представляє інтерес, синтез dsRNA, що підходить для використання з деякими варіантами здійснення винаходу, можна вибрати такий спосіб. По-перше, послідовність мРНК сканують, включаючи 3'-нетрансльовану ділянку і 5'-нетрансльовану ділянку.

По-друге, послідовність мРНК порівнюють з прийнятною основою геномних даних, використовуючи будь-яке програмне забезпечення для вирівнювання послідовності, таке як програмне забезпечення BLAST, доступне на сервері NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). Передбачені ділянки в послідовності мРНК, які показують значну гомологію з іншими кодуючими послідовностями, фільтруються.

Відповідні послідовності-мішені вибирають як шаблон для синтезу dsRNA. Кращими є ті послідовності, які мають якомога меншу гомологію з іншими генами в геномі, щоб зменшити ефект "непопадання в мішень".

В одному варіанті здійснення dsRNA може включати послідовність-мішень в інтрони, екзоні, 3'-нетрансльованій ділянці, 5'-нетрансльованій ділянці, або регуляторний елемент гена-мішені, або їх комбінації. В одному варіанті здійснення dsRNA даної заявки може включати сайт-мішень, що знаходиться в промоторі.

Слід розуміти, що агент сайленсінгу РНК в деяких варіантах здійснення винаходу необов'язково обмежений молекулами, що містять тільки РНК, але також включає хімічно модифіковані нуклеотиди і не нуклеотиди.

DsRNA може бути синтезована будь-яким способом, відомим в даній області техніки, включаючи ферментативний синтез і твердофазних синтез. Вони особливо підходять у випадку короткої полінуклеотидної послідовності з вищезазначеними модифікаціями або без них. Обладнання та реагенти для виконання твердофазного синтезу пропонуються до продажу, наприклад, компанією Applied Biosystems. Також можуть бути застосовані будь-які інші засоби для такого синтезу; сам синтез олігонуклеотидів знаходиться цілком у межах здібностей фахівця в даній області і може бути виконаний за добре випробуваною методикою, яка детально описана, наприклад, в наступних публікаціях: Sambrook, J. and Russell, DW (2001), "Molecular Cloning: A Laboratory Manual"; Ausubel, R. M. et al., Eds. (1994, 1989), "Current

Protocols in Molecular Bi-ology," Volumes I-III, John Wiley & Sons, Baltimore, Maryland; Perbal, B. (1988), "A Practical Guide to Molecular Cloning," John Wiley & Sons, New York; i Gait, M. J., ed. (1984), "Oligonucleotide Synthesis"; з використанням твердофазного реагенту, наприклад, ціаноетил фосфорамідиту, після чого виконують депротекцію, знесолення та очистку автоматизованим способом з тритилоном або ВЕРХ (високоєфективна рідинна хроматографія, далі ВЕРХ або HPLC).

Як сказано вище, голу молекулу dsRNA вводять в прямий контакт з насінною. Насіння може бути від будь-якої рослини, такої як надродина Viridiplantae, що включає однодольні та дводольні рослини. Інші рослини перераховані в даному документі нижче. Відповідно до одного з варіантів здійснення винаходу, клітини рослини включають РНК-залежну РНК-полімеразну активність і РНК молекулу-мішень, щоб забезпечити ампліфікацію dsRNA.

Термін "рослина", використовуваний в даному документі, включає цільні рослини, предків і потомство рослин і частини рослини, включаючи насіння, пагони, стебла, корені (включаючи бульби), і ізолювані клітини, тканини і органи рослини. Рослина може бути в будь-якій формі, включаючи суспензійні культури, зародки, меристематичні ділянки, тканину калусу, листя, гаметофіти, спорофіти, пилки і мікроспори. Слід розуміти, що рослина або її насіння можуть бути трансгенними.

Використовувана в даному документі фраза "клітина рослини" відноситься до клітин рослин, які отримані та ізолювані з дезінтегрованою клітинної тканини рослин або культур клітин рослин. Клітини рослини можуть бути репродуктивними (тобто, клітинами з тканини, що прямо сприяють статевій репродукції рослини) або нерепродуктивними (тобто, клітинами з тканини, що не беруть участь в статевій репродукції рослини). Клітинами рослини можуть бути клітини, які здатні регенеруватися в цільну рослину, або клітину, які не можуть регенеруватися в цільну рослину, наприклад, зрілі клітини ситовидних трубок з віддаленими ядрами.

Використовувана в даному документі фраза "культура клітин рослини" відноситься до будь-якого типу нативних (природних) клітин рослин, клітинних ліній рослин та генетично модифікованих клітин рослин, які не асембловані для формування повної рослини, так що щонайменше одна біологічна структура рослини відсутня. За вибором, культура клітин рослини в даному аспекті даного винаходу може включати конкретний тип клітини рослини або деяке число різних типів клітин рослини. Слід сказати, що, за вибором, культури рослин, що мають конкретний тип клітини рослини, можуть бути спочатку отримані з деякого числа таких клітин рослин різних типів.

Відповідно до деяких варіантів здійснення винаходу передбачено будь-яке комерційно або науково значуща рослина. Рослини, які особливо підходять для способів винаходу, включають всі рослини, які ставляться до надродини зелених рослин, зокрема однодольні та дводольні рослини, що включають кормові бобові рослини, декоративні рослини, харчові сільськогосподарські культури, дерева або чагарники, які вибираються зі списку, що включає *Acacia* spp., *Acer* spp., *Actinidia* spp., *Aesculus* spp., *Agathis australis*, *Albizia amara*, *Alsophila tricolor*, *Andropogon* spp., *Arachis* spp., *Areca catechu*, *Astelia fragrans*, *Astragalus cicer*, *Baikiaea plurijuga*, *Betula* spp., *Brassica* spp., *Bruguiera gymnorrhiza*, *Burkea africana*, *Butea frondosa*, *Cadaba farinosa*, *Calliandra* spp., *Camellia sinensis*, *Canna indica*, *Capsicum* spp., *Cassia* spp., *Centroema pubescens*, *Chacoomeles* spp., *Cinnamomum cassia*, *Coffea arabica*, *Colophospermum mopane*, *Coronilla varia*, *Cotoneaster serotina*, *Crataegus* spp., *Cucumis* spp., *Cupressus* spp., *Cyathea dealbata*, *Cydonia oblonga*, *Cryptomeria japonica*, *Cymbopogon* spp., *Cynthea dealbata*, *Cydonia oblonga*, *Dalbergia monetaria*, *Davallia divaricata*, *Desmodium* spp., *Dicksonia squarosa*, *Dibeteropogon amplexans*, *Dioclea* spp., *Dolichos* spp., *Dorycnium rectum*, *Echinochloa pyramidalis*, *Ehrhaffia* spp., *Eleusine coracana*, *Eragrestis* spp., *Erythrina* spp., *Eucalyptus* spp., *Euclea schimperii*, *Eulalia vi / losa*, *Pagopyrum* spp., *Feijoa sellowiana*, *Fragaria* spp., *Flemingia* spp., *Freycinetia banksii*, *Geranium thunbergii*, *GinAgo biloba*, *Glycine javanica*, *Gliricidia* spp., *Gossypium hirsutum*, *Grevillea* spp., *Guibourtia coleosperma*, *Hedysarum* spp., *Hemaphysa altissima*, *Heteropogon contortus*, *Hordeum vulgare*, *Hyparrhenia rufa*, *Hypericum erectum*, *Hypeffhelia dissolute*, *Indigo incamata*, *Iris* spp., *Leptarrhenia pyrolifolia*, *Lespedeza* spp., *Lettuca* spp., *Leucaena leucocephala*, *Loudetia simplex*, *Lotonus bainesii*, *Lotus* spp., *Macrotyloma axillare*, *Malus* spp., *Manihot esculenta*, *Medicago sativa*, *Metasequoia glyptostroboides*, *Musa sapientum*, *Nicotianum* spp., *Onobrychis* spp., *Ornithopus* spp., *Oryza* spp., *Peltophorum africanum*, *Pennisetum* spp., *Persea gratissima*, *Petunia* spp., *Phaseolus* spp., *Phoenix canariensis*, *Phormium cookianum*, *Photinia* spp., *Picea glauca*, *Pinus* spp., *Pisum sativum*, *Podocarpus totara*, *Pogonarthria fleckii*, *Pogonaffhria squarrosa*, *Populus* spp., *Prosopis cineraria*, *Pseudotsuga menziesii*, *Pterolobium stellatum*, *Pyrus communis*, *Quercus* spp., *Raphiolepis umbellata*, *Rhopalostylis sapida*, *Rhus natalensis*, *Ribes grossularia*, *Ribes* spp., *Robinia pseudoacacia*, *Rosa* spp., *Rubus* spp., *Salix* spp., *Schyzachyrium sanguineum*, *Sciadopitys*

vefficillata, Sequoia sempervirens, Sequoiadendron giganteum, Sorghum bicolor, Spinacia spp., Sporobolus fimbriatus, Stiburus alopecuroides, Stylosanthos humilis, Tadehagi spp, Taxodium distichum, Themeda triandra, Trifolium spp., Triticum spp., Tsuga heterophylla, Vaccinium spp., Vicia spp., Vitis vinifera, Watsonia pyramidata, Zantedeschia aethiopica, Zea mays, амарант, артишок, спаржу, броколі, брюссельську капусту, капусту, моркву, цвітну капусту, селеру, листову капусту, льон, кормову капусту, сочевицю, ріпак, бамію, цибулю, картоплю, рис, сою, солому, цукровий буряк, цукровий очерет, томат, гарбуз, кукурудзу, пшеницю, ячмінь, жито, овес, арахіс, горох, сочевицю і люцерну, бавовну, ріпак, канолу, перець, соняшник, тютюн, баклажан, евкаліпт, будь-яке дерево, будь-яка декоративне рослина, багаторічну траву і будь-яку фуражну культуру. Альтернативно, водорості та інші рослини, що не відносяться до зелених, можуть бути використані в способах даного винаходу.

Відповідно до деякого варіанту здійснення винаходу, рослина, що використовується в способі винаходу є сільськогосподарською культурою, включаючи, але без обмеження, бавовну, овочі сімейства капустяних, ріпак, кунжут, оливкове дерево, пальму, банан, пшеницю, кукурудзу, овес, люцерну, арахіс, соняшник, рис, овес, цукровий очерет, сою, дерноутворювальні рослини, ячмінь, жито, сорго, цикорій, салат, томат, цукіні, солодкий перець, баклажан, огірок, диню, кавун, боби, гібіскус, бамію, яблуко, троянду, суницю, перець чилі, часник, горох, сочевицю, канолу, мамс, Arabidopsis, броколі, капусту, буряк, лободу, шпинат, гарбуз, цибулю, цибулю-порей, тютюн, картоплю, цукровий буряк, папайю, ананас, манго, Arabidopsis thaliana, а також рослини, використовувані в садівництві, квітникарстві або лісовому господарстві, такі як, але без обмеження, тополя, ялиця, евкаліпт, сосна, будь-яка декоративна рослина, будь-яка багаторічна трава і будь-яка фуражна культура, хвойні дерева, мох, водорості, а також інші рослини, перераховані на сайті www.nationmaster.com/encyclopedia/Plantae.

Відповідно до одного специфічного варіанту здійснення, рослину вибирають з групи, що складається з кукурудзи, рису, пшениці, томату, бавовни і сорго.

Відповідно до одного специфічного варіанту здійснення, насінною є насінина без оболонки або свіжим насінням, яке не було піддане хімічній або фізичній обробці.

У деяких варіантах здійснення промивку насіння здійснюють протягом від 30 хвилин до 4 годин. Інші приклади часу промивки становлять від 1 хвилини до 10 хвилин, від 10 хвилин до 30 хвилин. Відповідно до деяких варіантів здійснення, промивка насіння може тривати всього 5, 10, 20, 30, 45 або 60 секунд. Розчин для промивання може включати слабкий детергент, такий як Tween-20. Концентрація детергенту може становити 0,01 - 0,2% або 0,2 - 1%. Відповідно до ще одного варіанту здійснення, концентрація детергенту може становити приблизно 0,001%, 0,005%, 0,01%, 0,05%, 0,1%, 0,5%, 1% або вище.

Насінина може піддаватись праймінгу або промиванню перед контактом з dsRNA.

Використовуваний в даному документі термін "праймінг" відноситься до управління рівнем гідрататії насіння, щоб могла проходити метаболічна активність, необхідна для проростання, але запобігалась поява зародкових корінців. Різні види фізіологічної активності в насінині відбуваються при різних рівнях вологості (Leopold and Vertucci, 1989; Taylor, 1997). Останньою фізіологічною активністю в процесі проростання є поява зародкових корінців. Ініціація появи зародкових корінців вимагає високого вмісту води в насінині. При обмеженні вмісту води в насінині всі метаболічні етапи, необхідні для проростання, можуть відбуватися без незворотньої дії появи зародкових корінців. Перед появою зародкових корінців насінина вважається такою, що переживає зневоднення, так що вміст вологи в замоченій в праймінговому розчині насінині може бути знижено за допомогою сушіння. Після сушіння замочене у праймінговому розчині насіння може зберігатися до часу посіву.

У комерційних цілях використовуються різні способи праймінгу. Здається, що найбільші наслідки серед них мають рідинний або осмотичний праймінг і праймінг у твердій матриці (Khan et al., 1991).

Відповідно до одного з варіантів здійснення винаходу, праймінг здійснюють в присутності солі, хелатного агента, поліетиленгліколю або їх комбінації (наприклад, хелатного агента і солі).

Альтернативно, праймінг здійснюють у присутності води, такої як деіонізована вода або двічі деіонізована вода. Відповідно до одного специфічного варіанту здійснення, праймінг здійснюють у присутності 100% двічі деіонізованої води.

Зазвичай використовують кілька типів праймінгу насінини:

осмопраймінг (осмо-кондиціювання) - стандартний спосіб праймінгу. Насіння інкубують в добре аераційних розчинах з низьким потенціалом води і після цього промивають і сушать. Низький потенціал води для таких розчинів може бути досягнутий шляхом додавання таких осмотиків як манітол, поліетиленгліколь (ПЕГ) або солі, такі як KCl;

гідропраймінг (праймінг в барабані) - здійснюється шляхом неперервного або послідовного

додавання обмеженого об'єму води до насіння. Для цієї мети використовують барабан, і воду можна подавати вологим повітрям. "Замочування на фермі" є дешевим і відповідним способом, який здійснюють шляхом інкубації насіння (злакових, бобових) протягом обмеженого часу в теплій воді;

5 матричний праймінг (матричне кондиціювання) - це інкубація насіння у твердій нерозчинній матриці (вермикуліт, діатомова земля, зшиті полімери з високою здатністю абсорбувати воду) з обмеженим об'ємом води. Цей спосіб забезпечує повільне вбирання.

Попередньо пророщене насіння - цей спосіб можливий тільки для небагатьох видів. На протигагу нормальному праймінгу насінню дають можливість випустити зародкові корінці. Після цього застосовують сортування за специфічними стадіями, обробку, яка повторно індукуює толерантність до зневоднення, і сушіння. Використання попередньо пророщеного насіння дозволяє отримати швидкий і рівномірний розвиток розсади.

Так, відповідно до одного варіанту здійснення, насіння замочують в праймінговому розчині.

15 Слід сказати, що насіння можна обробляти водою (двічі дистильованою) перед контактом з dsRNA без здійснення праймінгу. Наприклад, обробка водою протягом короткого часу (наприклад, від 30 секунд до 1 години, від 30 секунд до 0,5 години, від 30 секунд до 10 хвилин, від 30 секунд до 5 хвилин або від 45 секунд до 5 хвилин). Відповідно до деяких варіантів здійснення, обробка водою може тривати всього 5, 10, 20 або 30 секунд.

20 Слід розуміти, що молекула нетранскрибованого полінуклеотидного тригера, наприклад, dsRNA, може міститися у воді (наприклад, водопровідній, дистильованій або двічі дистильованій), тобто, що не містить солей у вищезгаданій ефективній концентрації для праймінгу, хелатних агентів, поліетиленгліколю або їх комбінацій (наприклад, хелатний агент і сіль). У деяких варіантах здійснення молекулу нетранскрибованого полінуклеотидного тригера, наприклад, dsRNA, вводять в насінину в буферному розчині, такому як ЕДТА.

25 У деяких варіантах здійснення насіння не замочують у праймінговому розчині.

Необмежений спосіб введення dsRNA в насінину представлений у Прикладі 1, який вважається невід'ємною частиною даного опису винаходу.

Температура на етапах промивання/праймінгу та сушіння може бути однаковою або різною.

Відповідно до одного варіанту здійснення, промивку/праймінг здійснюють при 4 - 28 °C.

30 Відповідно до одного варіанту здійснення, розчин для промивки/праймінгу або розчин, що містить dsRNA, позбавлений твердого носія.

Відповідно до одного варіанту здійснення, розчин для промивки/праймінгу або розчин, що містить dsRNA, позбавлений передавального агента, такого як ПАР (поверхнево-активні речовини, далі ПАР) або сіль.

35 Відповідно до ще одного варіанту здійснення винаходу, насіння, що піддавалось контакту з молекулою dsRNA, промивають, щоб видалити агенти, які впливали на насіння, такі як пестицид, фунгіцид, інсектицид, добриво, покриваючий засіб й фарбуючий засіб.

40 Так, відповідно до одного варіанту здійснення, насіння (перед обробкою за допомогою dsRNA) по суті вільне (тобто, не включає ефективні кількості) від пестициду, фунгіциду, інсектициду, добрива, покриваючого засобу й фарбуючого засобу.

Потім насіння піддають сушінню. У деяких варіантах здійснення сушіння не є обов'язковим.

Відповідно до одного варіанту здійснення, сушіння здійснюють при 20 - 37 °C, +20 - +30 °C, +22 - +37 °C, +15 - +22 °C або 20 - 25 °C протягом 10 - 20 годин, 10 - 16 годин або навіть 2 - 5 годин.

45 При розрахунку концентрації dsRNA в розчині для контакту слід враховувати різні чинники.

Вони залежать щонайменше від одного з розміру насінини, маси насінини, об'єму насінини, площі поверхні насінини, щільності насінини і проникності насінини.

50 Наприклад, що стосується розміру, маси, об'єму і площі поверхні насінини, за оцінками насіння кукурудзи вимагають більш тривалої обробки ніж насіння Arabidopsis і томата. Що стосується проникності і щільності, по оцінкам насіння пшениці вимагають більш тривалої обробки при більш високих концентраціях ніж насіння томата.

55 Приклади концентрації dsRNA в розчині для обробки включають, але без обмеження, 0,01 - 0,3 мкг/мкл, 0,01 - 0,15 мкг/мкл, 0,04 - 0,15 мкг/мкл, 0,1 - 100 мкг/мкл; 0,1 - 50 мкг/мкл, 0,1 - 10 мкг/мкл, 0,1 - 5 мкг/мкл, 0,1 - 1 мкг/мкл, 0,1 - 0,5 мкг/мкл, 0,15 - 0,5 мкг/мкл, 0,1 - 0,3 мкг/мкл, 0,01 - 0,1 мкг/мкл, 0,01 - 0,05 мкг/мкл, 0,02 - 0,04 мкг/мкл, 0,001 - 0,02 мкг/мкл. Відповідно до одного специфічного варіанту здійснення, концентрація dsRNA в розчині для обробки складає 0,01 - 0,15 або 0,04 - 0,15 мкг/мкл.

60 В одному варіанті здійснення концентрація dsRNA в розчині для обробки становить 0,01 - 0,3 мкг/мл, 0,01 - 0,15 мкг/мл, 0,04 - 0,15 мкг/мл, 0,1 - 100 мкг/мл, 0,1 - 50 мкг/мл, 0,1 - 10 мкг/мл, 0,1 - 5 мкг/мл, 0,1 - 1 мкг/мл, 0,1 - 0,5 мкг/мл, 0,15 - 0,5 мкг/мл, 0,1 - 0,3 мкг/мл, 0,01 - 0,1 мкг/мл,

0,01 - 0,05 мкг/мл, 0,02 - 0,04 мкг/мл або 0,001 - 0,02 мкг/мл.

У ще одному варіанті здійснення, концентрація dsRNA в розчині для обробки складає приблизно 5 - 10 мкг/мл, 10 - 15 мкг/мл, 15 - 20 мкг/мл, 20 - 25 мкг/мл; 25 - 30 мкг/мл, 30 - 35 мкг/мл, 35 - 40 мкг/мл, 40 - 45 мкг/мл, 45 - 50 мкг/мл, 50 - 55 мкг/мл, 55 - 60 мкг/мл, 60 - 65 мкг/мл, 65 - 70 мкг/мл, 70 - 75 мкг/мл, 75 - 80 мкг/мл, 80 - 85 мкг/мл, 85 - 90 мкг/мл, 90 - 95 мкг/мл, 95 - 100 мкг/мл, 100 - 105 мкг/мл, 105 - 110 мкг/мл, 110 - 115 мкг/мл, 115 - 120 мкг/мл, 120 - 125 мкг/мл; 125 - 130 мкг/мл, 130 - 135 мкг/мл, 135 - 140 мкг/мл, 140 - 145 мкг/мл, 145 - 150 мкг/мл, 150 - 155 мкг/мл, 155 - 160 мкг/мл, 160 - 165 мкг/мл, 165 - 170 мкг/мл, 170 - 175 мкг/мл, 175 - 180 мкг/мл, 180 - 185 мкг/мл, 185 - 190 мкг/мл, 190 - 195 мкг/мл, 195 - 200 мкг/мл, 200 - 210 мкг/мл, 210 - 220 мкг/мл, 220 - 230 мкг/мл, 230 - 240 мкг/мл, 240 - 250 мкг/мл, 250 - 260 мкг/мл, 260 - 270 мкг/мл, 270 - 280 мкг/мл, 280 - 290 мкг/мл, 290 - 300 мкг/мл, 300 - 310 мкг/мл, 310 - 320 мкг/мл, 320 - 330 мкг/мл, 330 - 340 мкг/мл, 340 - 350 мкг/мл, 350 - 360 мкг/мл, 360 - 370 мкг/мл, 370 - 380 мкг/мл, 380 - 390 мкг/мл, 390 - 400 мкг/мл, 400 - 410 мкг/мл, 410 - 420 мкг/мл, 420 - 430 мкг/мл, 430 - 440 мкг/мл, 440 - 450 мкг/мл, 450 - 460 мкг/мл, 460 - 470 мкг/мл, 470 - 480 мкг/мл, 480 - 490 мкг/мл або приблизно 490 - 500 мкг/мл.

У ще одному варіанті здійснення концентрація dsRNA в розчині для обробки складає 0,0001 - 3 мкг/мл, 0,0001 - 2,5 мкг/мл, 0,0001 - 2 мкг/мл, 0,0001 - 1,5 мкг/мл, 0,0001 - 1 мкг/мл, 0,0001 - 0,9 мкг/мл, 0,0001 - 0,8 мкг/мл, 0,0001 - 0,7 мкг/мл, 0,0001 - 0,6 мкг/мл, 0,0001 - 0,5 мкг/мл, 0,0001 - 0,4 мкг/мл, 0,0001 - 0,3 мкг/мл, 0,0001 - 0,2 мкг/мл, 0,0001 - 0,1 мкг/мл, 0,0001 - 0,05 мкг/мл, 0,0001 - 0,02 мкг/мл, 0,0001 - 0,01 мкг/мл, 0,0001 - 0,005 мкг/мл, 0,0001 - 0,001 мкг/мл або 0,0001 - 0,0005 мкг/мл.

У ще одному варіанті здійснення концентрація dsRNA в розчині для обробки складає 0,0001 - 3 мкг/мл, 0,0005 - 3 мкг/мл, 0,001 - 3 мкг/мл, 0,005 - 3 мкг/мл, 0,01 - 3 мкг/мл, 0,05 - 3 мкг/мл, 0,1 - 3 мкг/мл, 0,2 - 3 мкг/мл, 0,3 - 3 мкг/мл, 0,4 - 3 мкг/мл, 0,5 - 3 мкг/мл, 0,6 - 3 мкг/мл, 0,7 - 3 мкг/мл, 0,8 - 3 мкг/мл, 0,9 - 3 мкг/мл, 1 - 3 мкг/мл або 2 - 3 мкг/мл.

У ще одному варіанті здійснення концентрація dsRNA в розчині для обробки складає 0,0001 - 3 мкг/мл, 0,0005 - 2,5 мкг/мл, 0,001 - 2 мкг/мл, 0,005 - 1,5 мкг/мл, 0,01 - 1 мкг/мл, 0,05 - 0,5 мкг/мл, 0,1 - 0,4 мкг/мл або 0,2 - 0,3 мкг/мл.

Відповідно до одного специфічного варіанту здійснення контакт з dsRNA здійснюють у присутності хелатного агента, такого як ЕДТА, або іншого хелатного агента, такого як ДТПА (діетилентріамінпентаоцтова кислота, далі ДТПА або ДТРА) (0,01 - 0,1 мМ).

У деяких варіантах здійснення розчин для обробки може включати агент перенесення, такий як ПАР або сіль. Приклади таких агентів переносу включають, але без обмеження, солі, такі як натрієві або літієві солі жирних кислот (таких як жир, або талеві аміни, або фосфоліпіди, ліпофектамін або ліпофектін (1 - 20 нМ або 0,1 - 1 нМ)) і кремнійорганічні ПАР. Інші відповідні ПАР включають кремнійорганічні ПАР, включаючи неіонні кремнійорганічні ПАР, наприклад, ПАР на основі трісілоксан етоксілату, або сополімер кремнію і поліефіру, такий як сополімер гептаметилтрісілоксана, модифікованого поліалкіленом, і метиловий ефір алілокси поліпропіленгліколю (продається під товарним знаком Silwet™ L-77 і має номер CAS 27306-78-1 і номер EPA CAL.REG.NO. 5905-50073-AA, в даний час пропонується компанією Momentive Performance Materials, Олбані, Нью-Йорк).

У деяких варіантах здійснення розчин для обробки може включати фізичний агент. Приклади фізичних агентів включають: (а) абразиви, такі як карборунд, корунд, пісок, кальцит, пемза, гранат і т.д., (b) наночастинки, такі як вуглецеві нанотрубки, і (c) фізичну силу. Вуглецеві нанотрубки розкриті Камом та ін. (Kam et al.) (2004) J. Am. Chem. Soc., 126 (22): 6850-6851, Лю та ін. (Liu et al.) (2009) Nano Lett., 9 (3): 1007-1010, і Ходаковською та ін. (Khodakovskaya et al.) (2009) ACS Nano, 3 (10): 3221-3227. Агенти фізичної сили можуть включати нагрівання, охолодження, застосування позитивного тиску або ультразвукову обробку. Агенти для лабораторного кондиціонування рослини для проникнення полінуклеотидів включають, наприклад, застосування хімічного агента, ферментативну обробку, нагрів або охолодження, обробку позитивним чи негативним тиском, ультразвукову обробку. Агенти для кондиціонування рослин в полі включають хімічні агенти, такі як ПАР і солі.

Контакт насіння з dsRNA може бути здійснений будь-яким способом, відомим в даній області техніки, якщо ефективна кількість dsRNA потрапляє в насіння. Приклади включають, але без обмеження, просочування, розпилення або покриття порошком, емульсією, суспензією або розчином; також, молекули полінуклеотида наносять на рослину будь-яким відомим способом, наприклад, розпиленням або обтиранням розчином, емульсією або суспензією.

Використовуваний в даному документі термін "ефективна кількість" відноситься до кількості dsRNA, якого достатньо для зниження активності гена-мішені щонайменше на 20%, 30%, 40%,

50% або більше, наприклад, на 60%, 70%, 80 %, 90% або навіть на 100%. Ефективна кількість може бути результатом формування ампліфікації в рослині або фітопатогені.

Відповідно до одного специфічного варіанту здійснення контакт може бути здійснений шляхом просочування (тобто інокуляції), так що збовтування насіння з розчином для обробки може поліпшити проникнення і просочування і, тому, скоротити час обробки. Збовтування зазвичай виконують при 50 - 150 об/хв і залежно від об'єму розчину для обробки. Збовтування може здійснюватися протягом 4 - 24 годин (1 – 4 годин, 10 хвилин – 1 година або 30 секунд - 10 хвилин). Дана заявка також передбачає короткий час інкубації, такий як до 10 хвилин. Приклади включають, але без обмеження, 30 секунд - 7 хвилин, 30 секунд - 5 хвилин, 30 секунд - 3 хвилини, 30 секунд - 2 хвилини, 30 секунд - 1 хвилина, 1 хвилина - 10 хвилин або 1 хвилина - 5 хвилин.

В одному варіанті здійснення час інкубації може становити 1 - 60, 2 - 60, 5 - 60, 10 - 60, 20 - 60, 30 - 60, 40 - 60, 50 - 60, 1 - 50, 1 - 40, 1 - 30, 1 - 20, 1 - 10, 1 - 5, 5 - 50, 10 - 40 і 20 - 30 секунд.

У ще одному варіанті здійснення, час інкубації може становити 1 - 60, 2 - 60, 5 - 60, 10 - 60, 20 - 60, 30 - 60, 40 - 60, 50 - 60, 1 - 50, 1 - 40, 1 - 30, 1 - 20, 1 - 10, 1 - 5, 5 - 50, 10 - 40 і 20 - 30 хвилин.

У межах обсягу представлених варіантів здійснення також розглядається занурення. Так, насіння занурюють у розчин dsRNA на кілька секунд, наприклад, 1 - 10 секунд, 1 - 5 секунд, 1 - 3 секунди або 1 - 2 секунди. Протягом цього періоду dsRNA може вбратися в поверхню насінини. Вибрана dsRNA, яка покриває насінину, може проникати в насіння або розсаду під час проростання. Інкубацію проводять у темряві при 4 - 28 °C або 15 - 22 °C (наприклад, при 8 - 15 °C, 4 - 8 °C, 22 - 28 °C).

В одному варіанті здійснення час занурення може становити 1 - 60, 2 і 60, 5 і 60, 10 і 60, 20 і 60, 30 і 60, 40 і 60, 50 і 60, 1 і 50, 1 і 40, 1 і 30, 1 і 20, 1 і 10, 1 і 5, 5 і 50, 10 і 40, і 20 і 30 хвилин.

В одному варіанті здійснення, час занурення може становити 1 - 60, 2 - 60, 5 - 60, 10 - 60, 20 - 60, 30 - 60, 40 - 60, 50 - 60, 1 - 50, 1 - 40, 1 - 30, 1 - 20, 1 - 10, 1 - 5, 5 - 50, 10 - 40 і 20 - 30 секунд.

Відповідно до одного специфічного варіанту здійснення, контакт відбувається перед порушенням стану спокою насінини і появою зародка.

Після контакту, переважно перед порушенням стану спокою насінини і появою зародка, насіння може бути піддане обробці (наприклад, покриттю) вищевказаними агентами (наприклад, пестицидом, фунгіцидом і т.д.).

Контакт здійснюють так, що dsRNA надходить у зародок, ендосперм, оболонку або комбінацію з цих трьох органів.

Після контакту з розчином для обробки насіння може бути піддане сушінню протягом до 30 годин при 25 - 37 °C. Наприклад, насіння може сушитися протягом 16 годин при 30 °C.

Відповідно до одного специфічного варіанту здійснення, насінина (наприклад, ізольована насінина) включає екзогенну голу dsRNA, і причому щонайменше 10 або 20 молекул dsRNA знаходяться в ендоспермі ізольованої насінини.

Використовуваний в даному документі термін "ізольований" ставиться до відділення від природного фізіологічного середовища. У випадку насінини - ізольована насінина відокремлена від інших частин рослини. У випадку молекули нуклеїнової кислоти (наприклад, dsRNA) - вона відокремлена від цитоплазми.

Відповідно до одного специфічного варіанту здійснення, dsRNA не експресується з генома рослини, тому вона не є невід'ємною частиною генома.

Відповідно до одного специфічного варіанту здійснення, запропонована ізольована насінина, що включає екзогенну dsRNA, присутню в подібній концентрації (наприклад, приблизно 1:1, 2:1 або 1:2) в зародку і ендоспермі насінини. Передбачається, що пряме введення голої dsRNA в насінину призводить до підвищення концентрації dsRNA в ендоспермі в порівнянні з тією, що спостерігається, коли dsRNA експресується з експресуючого конструкту нуклеїнової кислоти.

Відповідно до одного специфічного варіанту здійснення, запропонована ізольована насінина, що включає екзогенну dsRNA, просторово розподілену у зародку і ендоспермі насінини рослини так, що просторовий розподіл відрізняється від просторового розподілу екзогенної dsRNA в насінині, отриманій від трансгенної рослини, яка рекомбінантно експресує таку екзогенну dsRNA.

Способи вимірювання локалізації молекул РНК в насінині добре відомі в даній галузі техніки. Одним прикладом є використання siGlo, що описано в розділі "Приклади".

Відповідно до альтернативного або додаткового варіанту здійснення, запропонована ізольована насінина, що включає екзогенну dsRNA, причому співвідношення концентрацій екзогенної dsRNA з дозріваючої з неї siRNA вище у насінині в порівнянні з трансгенною

насіниною, рекомбінантно експресуючим таку екзогенну dsRNA.

Використовуваний в даному документі термін "вище, більше" означає, щонайменше, приблизно 3%, 5%, 7%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% або навіть кілька разів.

Відповідно до альтернативного або додаткового варіанту здійснення, запропонована ізольована насінина, що включає екзогенну dsRNA, причому насінина рослини позбавлена гетерологічного промотора для стимуляції експресії такої екзогенної dsRNA, і причому просторовий розподіл такої екзогенної dsRNA та/або дозріваючої з неї siRNA змінено в насініні в порівнянні з просторовим розподілом в трансгенній насініні, що рекомбінантно експресує цю екзогенну dsRNA.

Термін "рекомбінантно експресуючий" відноситься до експресії з конструкту нуклеїнової кислоти.

Відповідно до ще одного варіанту здійснення, запропонована насінина рослини, яка може бути отримана (або вже отримана) будь-яким із способів, описаних у даному документі.

Способи визначення успішного введення dsRNA включають, але без обмежень, ЗТ-ПЛР (наприклад, кількісне визначення рівня гена-мішені або голої dsRNA), фенотипічний аналіз на біомасу, силу, врожайність і толерантність до стресу, архітектуру коренів, розміри листя, розмір і масу зерна, вміст олії, целюлози, а також способи біології клітини.

Відповідно до деяких варіантів здійснення, спостерігається зміна рівня експресії ортолога рослини гена комах-шкідників, на який націлена обробка насіниною, описана в даному документі. Дивіться, наприклад, Приклади 45 і 46 з розділу "Приклади", нижче.

Насіння може зберігатися протягом 1 доби - кількох місяців перед посадкою (наприклад, при 4 - 10 °C).

Отримана насінина може бути пророщена в темряві, щоб отримати рослину.

Таким чином, запропонована рослина або частина рослини, що включає екзогенну голу dsRNA і позбавлена гетерологічного промотора для стимуляції експресії dsRNA в рослині.

Використовувана в даному документі фраза "позбавлений гетерологічного промотора для стимуляції експресії dsRNA" означає, що рослина або клітина рослини не включає діючу в *cis*-положенні регуляторну послідовність (наприклад, гетерологічну), яка транскрибує dsRNA в рослині. Використовуваний в даному документі термін "гетерологічний" означає екзо-генний, такий, що не зустрічається в природному стані в нативній клітині рослини (за положенням інтеграції або такий, що знаходиться в штучному стані в клітині рослини). Таким чином, ізольоване насіння при відсутності послідовності гетерологічного промотора для стимуляції експресії dsRNA в рослині включає гомогенну (перед ампліфікацією) або гетерогенну (вторинні siRNA, після ампліфікації) популяцію нетранскрибованої dsRNA рослини.

Справжній спосіб може бути використаний для модуляції експресії гена, наприклад, в рослині, причому спосіб включає:

(а) контакт насіниною рослини з голою dsRNA в умовах, які дозволяють проникнення dsRNA в насінину, тим самим вводячи dsRNA в насінину; і, за вибором,

(b) генерацію насіниною рослини.

При використанні для зниження активності гена рослини голу dsRNA конструюють з бажаною специфічністю, використовуючи засоби біоінформатики, які добре відомі в даній області техніки (наприклад, BLAST).

Цей спосіб може бути використаний у різних умовах застосування, починаючи з фундаментальних досліджень, наприклад, з оцінки функції гена і закінчуючи отриманням рослин зі зміненими характеристиками, які є цінними для комерційного використання.

Такі рослини можуть мати характеристики, вигідні для сільського господарства, включаючи змінену морфологію, змінене цвітіння, змінену толерантність до стресу (тобто, біотичного та/або абіотичного), змінену біомасу, силу і/або врожайність і т.д.

Фраза "абіотичний стрес", використовувана в даному документі, відноситься до будь-якого несприятливого впливу на метаболізм, ріст, життєдіяльність та/або репродукцію рослини. Абіотичний стрес може бути індукований будь-яким з недостатньо оптимальних умов для росту в навколишньому середовищі, наприклад, дефіцитом води або посухою, повинню, заморозками, низькою або високою температурою, сильними вітрами, забрудненістю важкими металами, анаеробіозом, високими або низькими рівнями поживних речовин (наприклад, недоліком живильних речовин), високими або низькими рівнями вмісту солі (наприклад, засоленістю), забрудненням атмосфери, високою або низькою інтенсивністю світла (наприклад, недоліком освітлення) або УФ-випромінюванням. Абіотичний стрес може мати короткостроковий ефект (наприклад, гострий ефект, наприклад, який триває приблизно тиждень) або, альтернативно, може бути неминаючим (наприклад, хронічний ефект, наприклад, що триває, наприклад, 10 днів).

або більше). Даний винахід передбачає ситуації, в яких існує одна умова абіотичного стресу, або, альтернативно, ситуації, в яких мають місце два і більше абіотичних стресів.

Відповідно до одного з варіантів здійснення, абіотичний стрес відноситься до засоленості.

Відповідно до одного з варіантів здійснення, абіотичний стрес відноситься до посухи.

5 Відповідно до одного з варіантів здійснення, абіотичний стрес відноситься до температурного стресу.

Використовувана в даному документі фраза "толерантність до абіотичного стресу" відноситься до здатності рослини переносити абіотичний стрес без ознак істотного фізіологічного або фізичного пошкодження (наприклад, зміна у метаболізмі, рості, життєздатності та/або здатності до репродукції рослини).

10 Використовувана в даному документі фраза "ефективність використання азоту (далі ЕВА)" означає міру виробництва сільськогосподарської культури на одиницю внесеного азотного добрива. Ефективність використання добрива (далі ЕВД) є мірою ЕВА. Виробництво сільськогосподарської культури може бути виміряне по біомасі, силі або врожайності. 15 Ефективність використання азоту для рослини зазвичай є результатом зміни щонайменше одного з поглинання, розповсюдження, абсорбуючої здатності, накопичення, переміщення (в рослині) і використання азоту, абсорбованого рослиною. Підвищена ЕВА співвідноситься з такою у нетрансгенній рослині (тобто, за відсутності трансгена трансгенної рослини) того ж виду, на тій же стадії розвитку і вирощеного в тих же умовах.

20 Використовувана в даному документі фраза "умови, що обмежують постачання азотом" відноситься до умов росту, які включають рівень (наприклад, концентрацію) застосованого азоту (наприклад, амонію чи нітрату), який нижче рівня, необхідного для оптимального метаболізму, росту, репродукції та/або життєздатності рослини.

Використовуваний в даному документі термін/фраза "біомаса", "біомаса рослини" або 25 "рослинна біомаса" відноситься до кількості (наприклад, що вимірюється в грамах тканини повітряного сушіння) тканини, отриманої від рослини за сезон вирощування. Збільшення в рослинній біомасі може відбуватися у всій рослині або її частинах, таких як надземні (наприклад, що збираються як врожай) частини, вегетативна біомаса, коріння та/або насіння або їх вміст (наприклад, масло, крохмаль і т.д.).

30 Використовуваний в даному документі термін/фраза "сила", "сила рослини" або "рослинна сила" відноситься до кількості (наприклад, визначеною за масою) тканини, виробленої рослиною за певний період часу. Підвищена сила може визначати врожайність рослини, або врожайність на одиницю часу вирощування або одиницю площі вирощування або впливати на неї. Крім цього, рання сила (наприклад, насіння та/або розсади) призводить до поліпшення врожаю на корені. 35

Використовуваний в даному документі термін/фраза "врожайність", "врожайність рослини" або "рослинна врожайність" відноситься до об'єму (наприклад, визначеним за масою або розміром) або кількості (наприклад, численному) тканин або органів, продукованих на одну рослину або за один сезон вирощування. Підвищена врожайність рослини впливає на 40 економічну вигоду, яку можна отримати від рослини в певній галузі вирощування та/або за певний час вирощування.

Відповідно до одного варіанту здійснення, врожайність вимірюють за вмістом целюлози, вмісту масла, вмісту крохмалю тощо.

Відповідно до ще одного варіанту здійснення, врожайність вимірюють за вмістом масла.

45 Відповідно до ще одного варіанту здійснення, врожайність вимірюють за вмістом білка.

Відповідно до ще одного варіанту здійснення, врожайність вимірюють за кількістю насінин, масою насінини, кількістю плодів або масі плодів на одну рослину або її частини (наприклад, по серцевині, їстівної насінини).

На врожайність рослини можуть впливати різні параметри, включаючи, але без обмеження, 50 біомасу рослини, силу рослини, швидкість росту рослини, врожайність насінини, кількість насінин або зерен, якість насінини або зерен, врожайність за маслом, вміст олії, крохмалю та/або білка в прибраних органах (наприклад, насінні або вегетативних частинах рослини), кількість квіток (наприклад, квіток) на одну волоть (наприклад, виражена як співвідношення між наповненим насінням з кількістю первинних волотей), показник врожаю, кількість рослин, 55 вирощених на одиниці площі, кількість і розмір прибраних органів на одну рослину і на одиницю площі, кількість рослин на одиницю площі вирощування (наприклад, щільність), кількість прибраних органів на поле, сукупна площа листя, засвоєння вуглецю і розподіл вуглецю (наприклад, розподілення/розташування вуглецю в рослині), стійкість до затінення, кількість органів, які можуть бути прибрані (наприклад, насіння), кількість насіння на один стручок, маса 60 одної насінини і модифікована архітектура (така як збільшений діаметр стебла, товщина або

поліпшення фізичних властивостей (наприклад, пружності)).

Покращена ЕВА рослини транслюється в поле або в отримання подібної врожайності при застосуванні меншої кількості добрив, або в підвищену врожайність при застосуванні тих же кількостей добрив. Таким чином, поліпшена ЕВА або ЕВД здійснює прямий вплив на

5 врожайність рослини в полі.

Використовувана в даному документі фраза "біотичний стрес" відно-ситься до стресу, який відбувається в результаті пошкодження рослин іншими живими організмами, такими як бактерії, віруси, гриби, паразити, корисні та шкідливі комахи, бур'яни і культивовані або нативні рослини. У Прикладах 7 і 20 - 38 з розділу "Приклади", нижче, описана реалізація даного розкриття в

10 аспекті надання стійкості до *Spodoptera littoralis*. У Прикладах 38 і 39 з Розділу "Приклади", нижче, описана реалізація даного розкриття в аспекті надання стійкості до шкідників *Coleoptera*. У Прикладі 40 - 52 з Розділу "Приклади", нижче, описана реалізація даного розкриття в аспекті надання стійкості до вірусної інфекції.

Використовуваний в даному документі термін "поліпшення" або "підвищення" відноситься

15 щонайменше приблизно до 2%, щонайменше приблизно 3%, щонайменше приблизно 4%, щонайменше приблизно 5%, щонайменше приблизно 10%, щонайменше приблизно 15%, щонайменше приблизно 20%, щонайменше приблизно 25%, щонайменше приблизно 30%, щонайменше приблизно 35%, щонайменше приблизно 40%, щонайменше приблизно 45%, щонайменше приблизно 50%, щонайменше приблизно 60%, щонайменше приблизно 70%,

20 щонайменше приблизно 80% щонайменше приблизно 90% або більшого збільшення в ЕВА, в толерантності до стресу, у врожайності, в біомасі або в силі рослини в порівнянні з нативними рослинами або рослинами дикого типу (тобто, ізогенними рослинами (вирощеними не з насіння, обробленого за допомогою dsRNA) в представлених варіантах здійснення).

У деяких варіантах здійснення ген-мішень dsRNA може бути не ендегним геном рослини, а скоріше геном, екзогним для рослини, таким як ген фітопатогенного організму, який живиться рослиною або залежить від неї для росту/реплікації (наприклад, бактерії або віруси) та/або виживання. У деяких варіантах здійснення геном-мішенню є істотний ген комах-шкідника. У деяких варіантах здійснення геном-мішенню є ген вірусу.

Використовуваний в даному документі термін "фітопатоген" відноситься до організму, який

30 виграє від взаємодії з рослиною і здійснює від'ємний вплив на таку рослину. Термін "фітопатоген" включає комах, павуків, ракоподібних, гриби, бактерій, віруси, нематоди, плоских хробаків, круглих черв'яків, гостриків, анкілостом, стрічкових черв'яків, трипаносом, шистосом, оводів, бліх, кліщів, вошей і т.д., які можуть житися або контактувати з однією або декількома клітинами, тканинами або рідинами, які продукуються рослиною.

35 Способи, описані в даному документі, можуть бути використані для отримання рослини, яка стійка до одного або декількох фітопатоген. У деяких варіантах здійснення фітопатогеном є комах-шкідник. Якщо комах є шкідником-мішенню для даного винаходу, такі шкідники включають, але без обмеження: із ряду *Lepidoptera*, наприклад, *Acleris* spp., *Adoxophyes* spp., *Aegeria* spp., *Agrotis* spp., *Alabama argillaceae*, *Amylois* spp., *Anticarsia gemmatilis*, *Archips* spp., *Argyrotaenia* spp., *Autographa* spp., *Busseola fusca*, *Cadra cautella*, *Carposina nipponensis*, *Chilo* spp., *Choristoneura* spp., *Clysia ambiguella*, *Cnaphalocrocis* spp., *Cnephasia* spp., *Cochylis* spp., *Coleophora* spp., *Crocicidolomia binotalis*, *Cryptophlebia leucotreta*, *Cydia* spp., *Diatraea* spp., *Diparopsis castanea*, *Earias* spp., *Ephestia* spp., *Eucosma* spp., *Eupoecilia ambiguella*, *Euproctis* spp., *Euxoa* spp., *Grapholita* spp., *Hedya nubiferana*, *Heliothis* spp., *Hellula undali*, *Hyphantiria cunea*, *Keiferia lycopersicella*, *Leucoptera scitella*, *Lithocolletis* spp., *Lobesia botrana*, *Lymantria* spp., *Lyonetia* spp., *Malacosoma* spp., *Mamestra brassicae*, *Manduca sexta*, *Operophtera* spp., *Ostrinia nubilalis*, *Pammene* spp., *Pandemis* spp., *Panolis flammea*, *Pectinophora gossypiella*, *Phthorimaea operculella*, *Pieris rapae*, *Pieris* spp., *Plutella xylostella*, *Prays* spp., *Scirpophaga* spp., *Sesamia* spp., *Sparganothis* spp., *Spodoptera* spp., *Synanthedon* spp., *Thaumetopoea* spp., *Tortrix* spp., *Trichoplusia ni* і *Yponomeuta* spp.; із ряду *Coleoptera*, наприклад, *Agriotes* spp., *Anthonomus* spp., *Atomaria linearis*, *Chaetocnema tibialis*, *Cosmopolites* spp., *Curculio* spp., *Denrmestes* spp., *Diabrotica* spp., *Epilachna* spp., *Eremnus* spp., *Leptinotarsa decemlineata*, *Lissorhoptrus* spp., *Melolontha* spp., *Oryzaephilus* spp., *Otiorhynchus* spp., *Phlyctinus* spp., *Popillia* spp., *Psylliodes* spp., *Rhizopertha* spp., *Scarabeidae*, *Sitophilus* spp., *Sitotroga* spp., *Tenebrio* spp., *Tribolium* spp. і

40 *Trogoderma* spp.; із ряду *Orthoptera*, наприклад, *Blatta* spp., *Blattella* spp., *Gryllotalpa* spp., *Leucophaea maderae*, *Locusta* spp., *Periplaneta* spp., і *Schistocerca* spp.; із ряду *Isoptera*, наприклад, *Reticulitermes* spp.; із ряду *Psocoptera*, наприклад, *Liposcelis* spp.; із ряду *Anoplura*, наприклад, *Haematopinus* spp., *Linognathus* spp., *Pediculus* spp., *Pemphigus* spp. і *Phylloxera* spp.; із ряду *Mallophaga*, наприклад, *Damalinea* spp. і *Trichodectes* spp.; із ряду *Thysanoptera*,

50 наприклад, *Franklinella* spp., *Hercinothrips* spp., *Taeniothrips* spp., *Thrips palmi*, *Thrips tabaci* і

60

Scirtothrips aurantii; із ряду Heteroptera, наприклад, Cimex spp., Distantiella theobroma, Dysdercus spp., Euchistus spp., Eurygaster spp., Leptocoris spp., Nezara spp., Piesma spp., Rhodnius spp., Sahlbergella singularis, Scotinophara spp., Triatoma spp., Miridae family spp. такі як Lygus hesperus і Lygus lineolaris, Lygaeidae family spp. такі як Blissus leucopterus, і Pentatomidae family spp.; із
 5 ряду Homoptera, наприклад, Aleurothrixus floccosus, Aleyrodes brassicae, Aonidiella spp., Aphididae, Aphis spp., Aspidiotus spp., Bemisia tabaci, Ceroplaster spp., Chrysomphalus aonidium, Chrysomphalus dictyospermi, Coccus hesperidum, Empoasca spp., Eriosoma larigerum, Erythroneura spp., Gascardia spp., Laodelphax spp., Lacanium corni, Lepidosaphes spp., Macrosiphus spp., Myzus spp., Nhotettix spp., Nilaparvata spp., Paratoria spp., Pemphigus spp.,
 10 Planococcus spp., Pseudaulacaspis spp., Pseudococcus spp., Psylla spp., Pulvinaria aethiopica, Quadraspidiotus spp., Rhopalosiphum spp., Saissetia spp., Scaphoideus spp., Schizaphis spp., Sitobion spp., Trialeurodes vaporariorum, Trioza erytrae і Unaspis citri; із ряду Hymenoptera, наприклад, Acromyrmex, Atta spp., Cephus spp., Diprion spp., Diprionidae, Gilpinia polytoma, Hoplocampa spp., Lasius spp., Monoimorium pharaonis, Neodiprion spp., Solenopsis spp. і Vespa spp.;
 15 із ряду Diptera, наприклад, Aedes spp., Antherigona soccata, Bibio hortulanus, Calliphora erythrocephala, Ceratitis spp., Chrysomyia spp., Culex spp., Cuterebra spp., Dacus spp., Drosophila melanogaster, Fannia spp., Gastrophilus spp., Glossina spp., Hypoderma spp., Hyppobosca spp., Liriomyza spp., Lucilia spp., Melanagromyza spp., Musca spp., Oestrus spp., Orseolia spp., Oscinella frit, Pegomyia hyoscyami, Phorbia spp., Rhagoletis pomonella, Sciara spp., Stomoxys spp., Tabanus spp.,
 20 Tannia spp. і Tipula spp., із ряду Siphonaptera, наприклад, Ceratophyllus spp. і Xenopsylla cheopis і із ряду Thysanura, наприклад, Lepisma saccharina. Так, відповідно до одного варіанту здійснення, запропонований спосіб інгібування експресії гена-мішені в фітопатогенному організмі, причому спосіб включає надання (наприклад, харчування або контакт в умовах інфікування) фітопатогенному організму рослини, яка описана в даному документі (щонайменше частина її включає голу dsRNA), тим самим інгібуючи експресію гена-мішені в
 25 фітопатогенному організмі. У деяких варіантах здійснення геном-мішенню є "істотний ген". Використовуваний в даному документі термін "істотний ген" відноситься до гену організму, який має суттєве значення для його виживання або репродукції. У деяких варіантах здійснення ген-мішень експресований в травному тракті комах, наприклад, в вакулярній АТФазі. У деяких
 30 варіантах здійснення ген-мішень залучений до росту, розвитку та репродукції комах. Приклади таких генів включають, але без обмеження, ген CHD3 і ген бета-тубуліну.

Фітопатогенний організм відноситься до багатоклітинних організмів, наприклад, до комах, грибів, тварин або до мікроорганізмів, які можуть викликати захворювання рослини, включаючи віруси, бактерії, гриби, а також ооміцети, хітридіоміцети, водорості та нематоди.

У даному документі посилання на "нематоду" відноситься до члену філуму класу Нематоди. Члени сімейства Heteroderidae є осілими паразитами, які формують складні зв'язки з організмом-господарем. Вони відбирають живильні речовини з клітин інфікованого організму за допомогою спеціального зонда. Цистові нематоди (родів Heterodera і Globodera) і галові нематоди (роду Meloidogyne), зокрема, викликають значні економічні втрати в рослинах,
 40 особливо в сільськогосподарських рослинах. Приклади цистових нематод включають, серед інших, H. avenae (злакова гетеродера), H. glycines (бурякова гетеродера) і G. pallida (картопляна гетеродера). Галові нематоди включають, наприклад, M. javanica, M. incognita і M. arenaria. Ці патогени створюють "місця годування" в рослині, викликаючи морфологічну трансформацію клітин коренів в гігантські клітини. Звідси, нематодна "інвазія" або "інфекція" відноситься до
 45 інвазії і живлення тканинами рослини-господаря. Інші нематоди, які викликають значні пошкодження, включають виразкову нематоду, таку як Pratylenchus, конкретно P. penetrans, яка інфікує кукурудзу, рис та овочі, P. brachyurus, яка інфікує ананас, і P. thornei, яка інфікує, крім іншого, пшеницю.

Кілька варіантів здійснення відносяться до способу інгібування експресії гена-мішені в комасі-шкіднику, причому спосіб включає надання (наприклад, шляхом харчування) цій комасі-шкіднику рослини, вирощеної з насінини, обробленої екзогенною dsRNA, яка описана в даному документі, ти самим інгібуючи експресію гена-мішені в комасі-шкіднику. Комахи, які можуть викликати пошкодження і захворювання у рослин, відносяться до трьох категорій, відповідно до
 50 їх способу живлення: гризучі, сисні і трубчасто-сисні. Основні пошкодження наносять гризучі комахи, які поїдають тканину рослини, таку як листя, квітки, бутони і пагони. Приклади цієї першої великої категорії комах включають жуків і їх личинок, гусениць, що будують павутинні гнізда, мішочниць і личинок метеликів та пильщиків (гусениці). Для порівняння, сисні комахи поміщають їх ротові органи в тканини листя, пагонів, гілок, квіток або плодів і висмоктують соки рослини. Типові приклади сисних комах включають, але без обмеження, тлю, червців
 60 борошнистих, трипсів і цикадок. На пошкодження, викликані цими шкідниками, часто вказує

знебарвлення, пониклість, в'янення і загальна відсутність сили в ураженої рослини.

Кілька варіантів здійснення відносяться до способу отримання стійкості до комах-шкідника, причому спосіб включає вирощування рослини з насінини, обробленої екзогенною dsRNA, яка описана в даному документі. У деяких варіантах здійснення комаху-шкідника вибирають із рядів

5 Coleoptera, Lepidoptera, Diptera, Orthoptera, Heteroptera, Stenophalides, Arachnidae і Hymenoptera. У деяких варіантах здійснення комахою-шкідником є жук або личинка. Відповідно до одного специфічного варіанту здійснення, фітопатогеном є представник сімейства Noctuidae, наприклад, *Spodoptera littoralis*.

10 Приклади важливих бактеріальних патогенів рослин включають, але без обмеження, Burkholderia, Proteobacteria (*Xanthomonas* spp. і *Pseudomonas* spp., *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*).

Деяка кількість родів вірусів передається, як постійно, так і не постійно, земляними, що мають зооспори найпростішими. Ці найпростіші самі не є фітопатогенами, а паразитами. Передача вірусу відбувається, коли вони стають пов'язаними з корінням рослини. Приклади

15 включають *Polymyxa graminis*, які доведено передають вірусні захворювання рослин зерновим культурам, і *Polymyxa betae*, які передають буряковий вірус некротичних жовтих прожилок. Плазмодіофори також створюють рани в коренях рослин, через які можуть проникати інші віруси.

20 Специфічні приклади вірусів, які можуть бути мішенями відповідно до даного розкриття, включають, але без обмеження:

(1) вірус мозаїки тютюну (TMV, РНК-вірус), який інфікує рослини, особливо тютюн та інших членів сімейства Solanaceae.

25 (2) вірус плямистого в'янення томата (TSWV, РНК-вірус), який викликає серйозні захворювання багатьох економічно важливих рослин, що представляють 35 сімейств рослин, включаючи дводольні та однодольні. Ця широка гама рослин-господарів, що включає декоративні, овочеві і польові культури, є унікальною серед рослин, інфікованих вірусами. Вірус відноситься до тосповірусів в басейні Середземного моря, впливає на овочеві культури, особливо на томат, перець і салат (Turina et al., 2012, Adv Virus Res 84: 403-437).

30 (3) вірус жовтої кучерявості листя томату (TYLCV), який передається білокрилкою, здебільшого впливає на рослини томата. Гемівіруси (ДНК-віруси) з роду Begomovirus (включаючи свіповіруси і легумовіруси) є найбільш спустошливими патогенами, що впливають на різні культивовані рослини, включаючи маніоку, батат, квасолю, томат, бавовну і зернові бобові культури (Rey et al. +2012, Viruses 4: 1753-1791). Члени сімейства включають TYLCV і вірус кучерявості листя томату (ToLCV).

35 (4) вірус мозаїки огірка (CMV) має широку гаму рослин-господарів і атакує великий діапазон овочів, декоративних та інших рослин (всього 191 вид з 40 сімейств). Найбільш важливі овочі, на які впливає вірус мозаїки огірка, включають перці (*Capsicum annuum* L.), гарбузи, томати (*Lycopersicon esculentum* Mill.) і банани (*Musa* L. spp.).

40 Інші овочі-господарі включають: огірок, мускусну диню, патисон, томат, шпинат, селеру, перці, крес-салат, буряк, батат, турнепс, чайот (мексиканський огірок), корнішон, кавун, гарбуз, цитрон, гарбуз пляшковий, лімську квасолю, кінські боби, цибулю, фізаліс, баклажан, картоплю, ревінь, моркву, кріп, фенхель, пастернак, петрушку, люфу і артишок (Chabbouh and Cherif, 1990, FAO Plant Prot. Bull. 38: 52-53.).

45 Декоративні рослини-господарі включають: китайську астру, хризантему, дельфініум, шавлію, герань, гілію, глідіолус, геліотроп, гіацинт, шпорник, лілію, нагідки, в'юнок пурпурний, настурції, барвінок, петунію, флокси, ротики, тюльпан і цинію (Chupp and Sherf, 1960; Agrios, 1978).

(5) Вірус картоплі Y (PVY) - один з найбільш важливих вірусів рослин, що впливає на продуктивність томату.

50 (6) Вірус мозаїки цвітної капусти (CaMV, ДНК-вірус (Rothnie et al., 1994)).

(7) Африканський вірус мозаїки маніоки (ACMV).

(8) Вірус прихованої мозаїки сливи (PPV) - найбільш руйнівне вірусне захворювання кісточкових плодів з роду *Prunus*.

55 (9) Вірус мозаїки багаття (BMV) - зазвичай інфікує *Bromus inermis* та інші трави, може знаходитись майже скрізь, де вирощують пшеницю.

(10) Вірус картоплі X (PVX) - для цього вірусу векторів комах або грибів не існує. Цей вірус викликає м'які симптоми або не викликає симптомів у більшості різновидів картоплі, але якщо присутній вірус картоплі Y, синергія між цими двома вірусами викликає серйозні симптоми у картоплі.

60 Додаткові віруси:

Вірус трістези цитрусових (CTV) - викликає найбільш економічно руйнівне захворювання цитрусових, включаючи гіркий апельсин (*Citrus aurantium*) і будь-який вид цитрусових, щеплений на коріння гіркого апельсина, солодкий апельсин (*C. sinensis*), грейпфрут (*C. paradisi*), лайм, севільський апельсин (*C. aurantifolia*) і мандарин (*C. reticulata*). Також відомо, що вірус CTV інфікує *Aeglopsis chevalieri*, *Afraegle paniculata*, *Pamburus missionis* і *Passiflora gracilis*. Вірус CTV поширений у всьому світі і може бути виявлений в будь-якому місці зростання цитрусових дерев.

Вірус жовтої карликовості ячменю (BYDV) - найбільш широко розповсюджене вірусне захворювання зернових культур. Він впливає на економічно важливі види сільськогосподарських культур, такі як ячмінь, овес, пшениця, кукурудза, тритикале і рис.

Вірус скручування листя картоплі (PLRV) - інфікує картоплю та інших членів сімейства Solanaceae.

Вірус рунистої карликовості томату (TBSV), РНК-вірус, член роду Tombusvirus, найбільш сильно впливає на томати і баклажани.

Додаткові матеріали:

Hamilton et al., 1981, J Gen Virol 54; 223-241 - згадує віруси TMV, PVX, PVY, CMV, CaMV.

Додаткові наукові статті:

Makkouk et al., 2012, Adv Virus Res 84; 367-402 - Віруси, що впливають на горох і квасолу з вузьким (некротична жовтяниця бобів (FBNYN)) і широким (вірус мозаїки люцерни (AMV) і CMV) діапазоном господарів.

Комахи-шкідники, що викликають захворювання рослин, включають, окрім інших, представників сімейств, наприклад, Apidae, Curculionidae, Scarabaeidae, Tephritidae, Tortricidae.

Ген-мішень фітопатогенного організму кодує продукт, істотний для життєздатності та/або інвазивної здатності патогена, тому зниження його активності (голою dsRNA) призводить до зниженої здатності патогена виживати і інфікувати клітини-господарі. Отже, таке зниження активності призводить до "негативного впливу" на підтримку життєздатності та/або інвазивної здатності фітопатогена, тобто, запобігає або знижує здатність патогена отримувати з клітин-господарів поживні речовини і виживати на них. Через таке зниження життєздатності та/або інвазивної здатності фітопатогена забезпечується стійкість та/або підвищена толерантність клітин рослини до інфекції, спричиненої патогеном. Гени патогена можуть бути націлені на зрілі (дорослі), незрілі (молоді) або зародкові стадії.

Приклади генів, істотних для життєздатності і/або інвазивної здатності патогена, представлені в даному документі. Такі гени можуть включати гени, що беруть участь у розвитку та репродукції, наприклад, факторів транскрипції (див., наприклад, Xue et al., 1993; Finney et al., 1988), регуляторів клітинного циклу, таких як білки wee-1 і pss-1 (див., наприклад, Wilson et al., 1999; Voxen et al., 1999) і мутанти, летальні для зародків (див., наприклад, Schnabel et al., 1991); білки, необхідні для моделювання, такі як колаген, ChR3 і LRP-1 (див., наприклад, Yochum et al., 1999; Kostrouchova et al., 1998; Ray et al., 1989); гени, що кодуєть білки, які беруть участь у рухливості/нервовій системі, наприклад, ацетилхолінестерази (див., наприклад, Piotee et al., 1999; Talesa et al., 1995; Arpagaus et al., 1998), рецептор ріанодину, такий як unc-68 (див., наприклад, Maryon et al., 1998; Maryon et al., 1996), і глутамат-керовані хлоридні канали або рецептор авермектини (див., наприклад, Cully et al., 1994; Vassilatis et al., 1997; Dent et al., 1997); гідролітичні ферменти, необхідні для отримання поживних речовин з господаря, наприклад, сироваткові протеїнази, такі як HGSP-1 і HGSP-III (див., наприклад, Lilley et al., 1997); гени-паразити, що кодуєть білки, необхідні для інвазії і створення сайту харчування, наприклад, целюлази (див., наприклад, de Boer et al., 1999; Rosso et al., 1999), і гени, що кодуєть білки, які направляють продукцію секретів стовпчиків або амфід, такі як білок sec-1 (див., наприклад, Ray et al., 1994; Ding et al., 1998); гени, що кодуєть білки, необхідні для визначення статі, наприклад, tra-1, tra-2 і egl-1, супресор ced9 (див., наприклад, Hodgkin, 1980; Hodgkin, 1977; Hodgkin, 1999; Gumieny et al., 1999; Zarkower et al., 1992); і гени, що кодуєть білки, необхідні для підтримки нормальної функції метаболізму і гомеостазу, наприклад, метаболізму стеролу, мутанти, летальні для зародків (див., наприклад, Schnabel et al., 1991), і транс-сплайсовані лідерні послідовності (див., наприклад, Ferguson et al., 1996), pos-1, цитоплазматичний білок "цинковий палець"; pie-1, цитоплазматичний білок "цинковий палець"; mei-1, АТФаза; dif-1, білок транспорту мітохондріальної енергії; rba-2, фактор асемблування хроматину; skp-1, фактор транскрипції; plk-1, кіназа; grb-1, субодиниця В G-білка; par-1, кіназа; bir-1, інгібітор апоптозу; mex-3, РНК-зв'язуючий білок, unc-37, субодиниця В G-білка; hln-2, фактор транскрипції; par-2, dnc-1, дінактин; par-6, dhc-1, важкий ланцюг динеїна; і pal-1, гомеобокс. Такі гени були клоновані з нематод-паразитів, таких як види *Meliodogone* і *Heterodera*, або можуть бути ідентифіковані фахівцем у даній області, що використовують

інформацію з послідовності з клонуваних ортологів *C. elegans* (геном *C. elegans* був секвенований і є доступним, див. The *C. elegans* Sequencing Consortium (1998)).

Кілька варіантів здійснення відносяться до способу надання рослині стійкості до патогену, причому спосіб включає контакт насінини з молекулою екзогенної dsRNA, що включає послідовність, яка по суті ідентична або по суті комплементарна до щонайменше 18 суміжних нуклеотидів гена фітопатогенного організму, і вирощування рослини з насінини. Використовувана в даному документі характеристика "стійкість до патогену" є характеристикою рослини, яка викликає стійкість рослини-господаря до атаки патогена, який зазвичай здатний нанести пошкодження рослині. Без прив'язки до якоїсь конкретної теорії, якщо фітопатоген отримує матеріал рослини, вирощеної з насінини, що включає голу dsRNA, експресія гена на патогені-мішені пригнічується, і пригнічення експресії гена на патогені-мішені призводить до стійкості рослини до цього патогену.

У варіантах здійснення, описаних у даному документі, ген-мішень може кодувати істотний білок або транскрибувати некодуючу РНК, теоретичну функцію якої вибирають з групи, що складається, крім іншого, з регуляції і транспорту іонів, синтезу ферментів, підтримання потенціалу клітинних мембран, біосинтезу амінокислот, деградації амінокислот, розвитку та диференціації, інфікування, проникнення, розвитку апресоріїв або гаусторій, росту міцелію, синтезу меланінів, синтезу токсинів, синтезу сідерофорів, споруючії, синтезу плодоносних органів, ділення клітин, метаболізму енергії, дихання і апоптозу.

Відповідно до одного специфічного варіанту здійснення, фітопатогенний організм вибирають з групи, що складається з гриба, нематоди, вірусу, бактерії і комах.

Для обґрунтування активності проти шкідників даний документ також передбачає спостереження смерті або інгібування росту і ступінь симптоматології господаря після згаданого надання.

Для підвищення протифітопатогенної активності варіанти здійснення даного винаходу крім того пропонують композицію, яка містить два або більше різних агентів, кожний з яких токсичний для того ж патогенного для рослини мікроорганізму, і щонайменше один з яких включає dsRNA, описану в даному документі. У певних варіантах здійснення другим агентом може бути агент, що вибирається з групи, яка складається з інгібіторів метаболічних ферментів, що у синтезі амінокислот або вуглеводів, інгібіторів поділу клітин, інгібіторів синтезу клітинних стінок, інгібіторів синтезу ДНК або РНК, інгібіторів гірази, інгібіторів асемблювання тубуліну, інгібіторів синтезу АТФ, розділяючих агентів окисного фосфорилування, інгібіторів синтезу білків, інгібіторів МАП-кінази (мітоген-активована протеїнкіназа, далі МАП-кіназа або MAPK), інгібіторів синтезу або окислення ліпідів, інгібіторів синтезу стеролів та інгібіторів синтезу меланінів.

У деяких варіантах здійснення насінини, що включає екзогенну dsRNA, яка описана в даному документі, обробляють неополінуклотидним пестицидом. Вважається, що поєднання рослини, яка проявляє біологічну активність проти шкідника-мішені в результаті обробки насінини, з якої вирощено рослину, з екзогенної dsRNA разом з обробкою насінини певними хімічними або білковими пестицидами дає несподівані синергічні переваги в насінні, що пройшли таку обробку, включаючи несподівано високу ефективність захисту від пошкодження шкідником-мішенню отриманої рослини. Вважається, що насіння в представлених варіантах здійснення мають властивість знижувати вартість використання пестицида, оскільки для отримання необхідного обсягу захисту потрібно менше пестициду ніж у випадку, коли ці новаторські композиції і спосіб не використовуються. Більше того, оскільки використовується менше пестициду, можна вважати, що запропонований спосіб буде безпечнішим для оператора і навколишнього середовища і потенційно менш дорожчим ніж відомі способи.

Якщо сказано, що деякі ефекти є "синергічними", це означає, що синергічні впливи цього поєднання на пестицидну активність (або ефективність), включають біологічну активність рослини, вирощеної з насінини, обробленої dsRNA, і пестициду. Однак мається на увазі, що такі синергічні впливи не обмежені пестицидною активністю, але також включають такі несподівані переваги як підвищений об'єм активності, вигідніший профіль активності за типом і величиною зменшення пошкоджень, зниження вартості пестициду і застосування, зниження розповсюдження пестициду в навколишньому середовищі, зниження впливу пестициду на персонал, зайнятий виробництвом, обробкою і посадкою насіння, і інші переваги, відомі фахівцям у даній галузі техніки.

Крім цього, рослини, отримані відповідно до опису представлених варіантів здійснення, або їх частини можуть мати змінену живильну або терапевтичну ефективність і, як такі, можуть застосовуватися в харчовій та фармацевтичній промисловості. Крім того, рослини, отримані відповідно до опису представлених варіантів здійснення, або їх частини можуть мати змінений вміст олії або целюлози і, як такі, можуть бути застосовані в будівництві або виробництві олії.

Насіння даного винаходу можуть бути упаковані в пристрій для вміщення насінини, що включає деяку кількість такого насіння, щонайменше деякі з яких (наприклад, 5%, 10% або більше) містять екзогенну голу dsRNA, причому ця насінини позбавлена гетерологічного промотора для стимуляції експресії dsRNA.

5 Пристроєм для вміщення насінини, може бути мішок, пластиковий мішок, паперовий мішок, контейнер з м'якою оболонкою або контейнер з твердою оболонкою.

Кілька варіантів здійснення, описаних у даному документі, відносяться до розчину для обробки насіння, що включає молекули нетранскрибованого полінуклеотидного тригера, наприклад, dsRNA, що включає послідовність, яка по суті комплементарна або по суті ідентично
10 щонайменше на 18 суміжних нуклеотидів гена-мішені. У деяких варіантах здійснення цей розчин може крім того включати буфер, наприклад, ЕДТА. Використовуваний в цьому документі термін "розчин" відноситься до однорідних сумішей і неоднорідних сумішей, таким як суспензії, колоїди, міцели та емульсії. У деяких варіантах здійснення розчин може бути представлений в наборі. У деяких варіантах здійснення набір може крім того включати одну або кілька насінин,
15 контейнери, праймінговий розчин і середовище для росту насінини.

Реагенти даного винаходу можуть бути упаковані як набір, що включає молекулу нетранскрибованого полінуклеотидного тригера, наприклад, dsRNA, інструкції з введення цієї молекули нетранскрибованого полінуклеотидного тригера, наприклад, dsRNA, в насіння і, за вибором, праймінговий розчин.

20 Композиції з деяких варіантів здійснення винаходу за бажанням можуть бути представлені в упаковці або роздавальному пристрої, який може містити одну або декілька доз, що містять активний інгредієнт. Упаковка може включати, наприклад, металеву або пластикову фольгу, тобто, мати форму блістера. Упаковка або роздавальний пристрій може супроводжуватися інструкцією з введення в насінини.

25 Відповідно до одного варіанту здійснення, молекула нетранскрибованого полінуклеотидного тригера, наприклад, dsRNA, і праймінговий розчин розміщені в різних контейнерах.

Використовуваний в даному документі термін "приблизно" відноситься до $\pm 10\%$.

Терміни "включає", "який включає", "включають", "який має" і їх однокорінні слова означають "включаючи, але без обмеження".

30 Термін "який складається з" означає "який включає і обмежений чимось".

Термін "складається по суті з" означає, що композиція, спосіб або структура можуть включати додаткові інгредієнти, етапи та/або частини, але тільки якщо такі додаткові інгредієнти, етапи та/або частини не суттєво змінюють базові та нові характеристики заявлених композиції, способу або структури.

35 Використовувана в даному документі форма однини включає посилання на множину, якщо з контексту явно не випливає інше. Наприклад, термін "з'єднання" або "щонайменше одне з'єднання" може включати деяку кількість сполук, включаючи їх суміші.

У тексті даної заявки різні варіанти здійснення даного винаходу можуть бути представлені у форматі діапазону. Слід розуміти, що опис у форматі діапазону наведено просто для зручності і стислості і не повинно тлумачитися як негнучке обмеження об'єму винаходу. Відповідно,
40 вказування діапазону повинно розглядатися як таке, що специфічно розкриває всі можливі піддіапазони, а також окремі числові значення в цьому діапазоні. Наприклад, вказування діапазону, такого як від 1 до 6, повинне розглядатися як таке, що специфічно розкриває такі піддіапазони, як від 1 до 3, від 1 до 4, від 1 до 5, від 2 до 4, від 2 до 6, від 3 до 6 і т.д., а також
45 окремі числа в цьому діапазоні, наприклад, 1, 2, 3, 4, 5 і 6. Це застосовується незалежно від ширини діапазону.

Якщо в даному документі вказано числовий діапазон, це означає, що він включає будь-яке число (дробове або ціле) в зазначеному діапазоні. Фрази "в діапазоні між" першим вказаним числом і другим вказаним числом і "від" першого вказаного числа "до" другого вказаного числа
50 використовуються в даному документі як такі, що взаємозамінюються, і включають перше і друге вказані числа і всі дробові і цілі числа між ними.

Використовуваний в даному документі термін "спосіб" відноситься до образу дій, засобів, прийомів і порядку виконання деякої задачі, включаючи, але без обмеження, той спосіб дій, засоби, прийоми і порядок, які або відомі, або можуть бути легко розроблені на основі образу дії, засобів, прийомів і порядку, відомих практикуючим фахівцям в областях агрономії, хімії, фармакології, біології, біохімії та медицини.

Слід розуміти, що певні ознаки винаходу, які для ясності описані в контексті окремих варіантів здійснення, також можуть бути об'єднані в один варіант здійснення. І навпаки, різні ознаки винаходу, які для стислості описані в контексті одного варіанта здійснення, також можуть
60 бути представлені окремо, або в будь-якому придатному поєднанні, або придатними для будь-

якого іншого описаного варіанта здійснення винаходу. Певні ознаки, описані в контексті різних варіантів здійснення, не повинні вважатися істотними ознаками цих варіантів здійснення, якщо тільки варіант здійснення не може бути здійснений без цих елементів.

Різні варіанти здійснення і аспекти даного винаходу, які описані вище та заявлені у розділі "Формула винаходу" нижче, знаходять експериментальну підтримку в подальших Прикладах. Ці Приклади представлені для цілей ілюстрації і не повинні тлумачитися як обмеження.

Приклади

Тепер перейдемо до прикладів, які разом з вищенаведеним описом ілюструють винахід, не обмежуючи його.

Говорячи загалом, номенклатура, використана в даному документі, та лабораторні процедури, застосовані в даному винаході включають молекулярні, біохімічні, мікробіологічний і рекомбінантні способи роботи з ДНК. Такі способи широко представлені в літературі. Дивіться, наприклад, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" Sambrook et al., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III Ausubel, RM, ed. (1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, New York (1988); Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, New York; Birren et al. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); способи, описані в патентах США 4,666,828; 4,683,202; 4,801,531; 5,192,659 і 5,272,057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volumes I-III Cellis, JE, ed. (1994); "Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique" by Freshney, Wiley-Liss, NY (1994), Third Edition; "Current Protocols in Immunology" Volumes I-III Coligan JE, ed. (1994); Stites et al. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8th Edition), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell and Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", WH Freeman and Co., New York (1980); доступні імуноаналізи широко описані в патентній і науковій літературі, див., наприклад, патенти США 3,791,932; 3,839,153; 3,850,752; 3,850,578; 3,853,987; 3,867,517; 3,879,262; 3,901,654; 3,935,074; 3,984,533; 3,996,345; 4,034,074; 4,098,876; 4,879,219; 5,011,771 і 5,281,521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, BD, and Higgins SJ, eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, BD, and Higgins SJ, eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) і "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996); які всі включені шляхом посилання, так якби вони були повністю викладені в даному документі. Інші загальні посилання представлені в тексті даного документа. Описані в них процедури вважаються добре відомими в даній галузі техніки і представлені для зручності читача. Вся інформація, яка міститься в них, включена в даний документ шляхом посилання.

Приклад 1: Протоколи для продукції dsRNA і обробки насінини

Отримання послідовностей dsRNA/siRNA.

DsRNA-послідовності були створені за параметрами, заданими для кожного гена, з використанням *in vitro* транскрипції ПЛР-продуктів. Частину мРНК, що включає відкриту рамку зчитування, 3'-нетрансльовану ділянку або 5'-нетрансльовану ділянку, для якої має бути продукована dsRNA, піддали ПЛР-ампліфікації з використанням ген-специфічних праймерів, які містять послідовність промотора T7 на будь-якій стороні. Цей продукт використовували в якості матриці для продукції dsRNA із застосуванням комерційних наборів, таких як набір MaxiScript dsRNA (компанія Life Technologies) або набір T7 High Yield RNA Synthesis (компанія NEB). Далі пробу обробили ДНК-ази Турбо при 37 °C протягом 15 - 30 хв., після чого обробили фенолом і здійснили осадження нуклеїнової кислоти. Далі, провели одну з двох різних реакцій: (1) dsRNA готова до використання, або (2) процесинг dsRNA ферментом Dicer (рибонуклеази III (скорочення Рнази III) (компанія NEB)), щоб створити малі інтерферуючі РНК (siRNA).

Для обробки насінини, яка описана нижче, використовували або dsRNA, або комбінацію dsRNA і siRNA.

Загальний протокол обробки насінини для сайленсінгу генів з використанням суміші dsRNA/siRNA.

Насіння органічної кукурудзи різновиду "попкорн" без оболонки, цільні насіння органічного рису без оболонки, насіння органічної сої та пшениці були куплені у компанії Nitsat Haduvdevan (Ізраїль). Насіння свіжих томатів були взяті з плодів томата M82, які вирощені в теплиці. Насіння рослин без оболонки або свіжі промили двічі дистильованою водою (далі ДДВ) перед обробкою протягом чотирьох годин. Потім насіння сушили при 30 °C протягом 10 - 16 годин. Після етапу сушіння насіння обробили розчином, що містить композицію dsRNA, виготовлену з dsRNA в

кінцевій концентрації 40 - 150 мкг/мл в 0,1 мМ ЕДТА. Обробку виконали шляхом обережного збовтування насіння в розчині протягом 24 годин в темній камері для росту при 15 °С. На кінець насіння двічі швидко промили і висадили в ґрунт або сушили протягом 0 - 30 годин і пророщували при 25 °С в темній камері для росту і висадили в ґрунт або саджали прямо в ґрунт. Контрольне насіння обробили таким же чином композицією без dsRNA або з неспецифічною dsRNA.

Приклад 2: стабільність DSRNA в розсаді рису, томату і сорго

В якості прикладу екзогенного гена, який не присутній/експресований в рослинах, відкриті рамки зчитування, що кодують репліказу і оболончатий білок CGMMV (ідентифікаційний номер AF417242), були використані в якості мішеней для обробки насіння рослин за допомогою dsRNA відповідно до протоколу, описаному в Прикладі 1. Насіння рису, томату й сорго промивали протягом 4 годин при 20 °С, насіння томата і сорго сушили при 30 °С, і насіння рису сушили при 20 °С протягом ночі. Насіння негайно обробили при 15 °С розчином з 132,7 мкг/мл dsRNA (кінцева концентрація) протягом 39 годин для рису, 93,8 мкг/мл dsRNA (кінцева концентрація) протягом 48 годин для томату і 75 мкг/мл dsRNA (кінцева концентрація) протягом 40 годин для сорго.

Кажучи коротко, отримані з вірусу відкриті рамки зчитування ампліфікували шляхом ПЛР зі специфічними прямими та зворотними праймерами, які містили послідовність T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3', SEQ ID NO: 1) на їх 5'-кінці (див. Таблицю 1, нижче). Продукти ПЛР очистили від агарозного гелю і, оскільки вони мають промотори T7 на обох кінцях, використовували їх в якості темплетів для T7-залежної транскрипції in vitro, що дало dsRNA-продукт генів CGMMV. ПЛР на гені домашнього господарства, тубуліну, використовували в якості позитивного контролю (прямий праймер 5'-GGTGCTCTGAACGTGGATG-3' (SEQ ID NO: 2), і зворотний праймер 5'-CATCATCGCCATCCTCATTTCTC-3' (SEQ ID NO: 3)).

DsRNA, гомологічна для вірусу мозаїки зеленої плямистості стабільна в розсаді рису. Насіння рису обробили при 15 °С розчином з 132,7 мкг/мл dsRNA (кінцева концентрація) протягом 39 годин, і виконали детекцію dsRNA. Через один тиждень після проростання dsRNA можна було детектувати в 9 з 10 саджанців. Детекцію кДНК тубуліну використовували як позитивного контролю якості кДНК. Через два тижні після проростання dsRNA детектували в 10 з 10 саджанців. Через три тижні після проростання dsRNA, гомологічну для вірусу мозаїки зеленої плямистості детектували в 5 з 5 проб з саджанців рису.

Таблиця 1

ПЛР-праймери, використані в якості темплетів для транскрипції in vitro і детекції dsRNA-продуктів CGMMV і CGMMV.

Назва вірусу	Назва продукту	Послідовність/SEQ ID NO продукту:	Прямий праймер/SEQ ID NO:	Зворотний праймер/SEQ ID NO:
1) CGMMV (Ідентифікаційний номер NCBI AF417242)	CGMVV dsRNA продукт 1	TAATACGACTCACTATAGGGGGTAAGCG GCATTCTAAACCTCCAAATCGGAGGTTGG ACTCTGCTTCTGAAGAGTCCAGTTCTGTT TCTTTTGAAGATGGCTTACAATCCGATCA CACCTAGCAAACCTTATTGCGTTTAGTGCT TCTTATGTTCCCGTCAGGACTTTACTTAAT TTTCTAGTTGCTTCACAAGGTACCGCTTT CCAGACTCAAGCGGGAAGAGATTCTTTC CGCGAGTCCCTGTCTGCGTTACCCTCGT CTGTCGTAGATATTAATTCTAGATTCCCA GATGCGGGTTTTTACGCTTTCCTCAACGG TCCTGTGTTGAGGCCTATCTTCGTTTCGC TTCTCAGCTCCACGGATACGCGTAATAG GGTCATTGAGGTTGTAGATCCTAGCAATC CTACGACTGCTGAGTCGCTTAACGCCGT AAAGCGTACTGATGACGCGTCTACGGCC GCTAGGGCTGAGATAGATAATTTAATAGA GTCTATTTCTAAGGGTTTTGATGTTTACG ATAGGGCTTCATTTGAAGCCGCGTTTTCG GTAGTCTGGTCAGAGGCTACCACCTCGA	TAATACGA CTCACTAT AGGGGGTA AGCGGCAT TCTAAACC/ (SEQ ID NO:5)	Набір 1: TAATACGACTCA CTATAGGGGAAG ACCCTCGAAACT AAGC/(SEQ ID NO:4)
			CTTCTTAT GTTCCCGT CAGG/ (SEQ ID NO:7)	Набір 2: ACTCAGCAGTCG TAGGATTG/(SEQ ID NO:6)

Таблиця 1

ПЛР-праймери, використані в якості темплетів для транскрипції in vitro і детекції dsRNA-продуктів CGMMV і CGMMV.

Назва вірусу	Назва продукту	Послідовність/SEQ ID NO продукту:	Прямий праймер/SEQ ID NO:	Зворотний праймер/SEQ ID NO:
		AAGCTTAGTTTCGAGGGTCTTCCCCTATAGTGAGTCGTATTA/(SEQ ID NO:8)		
	CGMMV dsRNA продукт 2	TAATACGACTCACTATAGGGGCTTTACCG CCTAAGAAGTCTGTACACTCCCTTGCG GGTGGTCTGAGGCTTCTTGAATTGGAATA TATGATGATGCAAGTGCCCTACGGCTCA CCTTGTTATGACATCGGCGGTAACATAC GCAGCACTTGTTCAAAGGTAGATCATATG TGCATTGCTGCAATCCGTGCCTAGATCTT AAAGATGTTGCGAGGAATGTGATGTACAA CGATATGATCACGCAACATGTACAGAGG CACAAGGGATCTGGCGGGTGCAGACCTC TTCCAACCTTCCAGATAGATGCATTCAGG AGGTACGATAGTTCTCCCTGTGCGGTCA CCTGTTTCAGACGTTTTCCAAGAGTGTTCC TATGATTTTGGGAGTGGTAGGGATAATCA TGCAGTCTCGTTGCATTCAATCTACGATA TCCCTTATTCTTCGATCGGACCTGCTCTT CATAGGAAAAATGTGCGAGTTTGTATGC AGCCTTTCATTTCTCGGAGGCATTGCTTT TAGGTTTCGCCTGTAGGTAATTTAAATAGT ATTGGGGCTCAGTTTAGGGTCGATGGTG ATGCCCTATAGTGAGTCGTATTA/(SEQ ID NO:11)	TAATACGACTCACTATAGGGGCTTACCGCCTAAGAAGTCTGTACACTCCCTTGCGGGTGGTCTGAGGCTTCTTGAATTGGAATATGATGATGCAAGTGCCCTACGGCTCACCTTGTTATGACATCGGCGGTAACATACGCAGCACTTGTTCAAAGGTAGATCATATGTGCATTGCTGCAATCCGTGCCTAGATCTTAAAGATGTTGCGAGGAATGTGATGTACAA	Набір 3: TAATACGACTCACTATAGGGGCTTACCGCCTAAGAAGT/(SEQ ID NO:9)

Насіння томату обробили при 15 °C, використавши 93,8 мкг/мл dsRNA (кінцева концентрація) протягом 48 годин, і насіння сорго обробили при 5 мкг/мл dsRNA (кінцева концентрація) протягом 40 годин. DsRNA CGMMV детектували за допомогою ЗТ-ПЛР у 5 з 13 саджанців томату, перевірених через 10 діб після проростання і в 3 з чотирьох саджанців сорго через 4 тижні після проростання.

Було встановлено, що екзогенна dsRNA стабільна щонайменше протягом трьох тижнів у саджанцях рису і щонайменше 10 діб у саджанцях томату і чотирьох тижнів в рослинах сорго.

ПРИКЛАД 3: DsRNA НЕ ІНТЕГРУЄТЬСЯ В ГЕНОМ РИСУ

Насіння рису обробили екзогенною dsRNA як у Прикладі 2. Проростали рослини і вирощували їх протягом п'яти тижнів, ДНК екстрагували і виконали реакції ПЛР, щоб продемонструвати, що dsRNA не інтегрується в геном рису. Використовували два набори праймерів, які дали позитивну реакцію при перевірці на рівні РНК. Набір 1 (див. Таблицю 2) праймерів містив праймери, що використовуються для ампліфікації темплету (всієї послідовності dsRNA). Набір 2 (див. Таблицю 3) містив праймери, які використовували у вищезазначених реакціях ПЛР. Ендогенний ген домашнього господарства рису (тубулін) використовували в якості позитивного контролю при реакції ПЛР (див. Таблицю 2).

Три різних реакції ПЛР з ДНК виконали на рослинах, оброблених і не оброблених dsRNA. Ампліфікованої ДНК, відповідної CGMMV, в будь-якій обробленій або не обробленій рослині не детектували.

Таблиця 2

Праймери тубуліну, використані для ПЛР-ампліфікації.

Назва та напрямок праймера	Послідовність праймера/(SEQ ID NO:)	Довжина праймера
----------------------------	-------------------------------------	------------------

osa_TubA1_736F	GGTGCTCTGAACGTGGATG (SEQ ID NO: 12)	19
osa_TubA1_1342R	CATCATCGCCATCCTCATTCTC (SEQ ID NO: 13)	22

Приклад 4: Молекули екзогенної dsRNA мають високу стабільність в розчині і не інкорпорується у геном оброблених рослин

Насіння кукурудзи обробили за протоколом, описаного в Прикладі 1. Насіння промивали протягом 4 годин при 20 °C, сушили при 30 °C протягом ночі і негайно обробили 40 мкг/мл dsRNA (кінцева концентрація), направленої проти репортерного гена β -глюкоронідази (GUS) протягом 60 годин при 15 °C, висушили і проростили. Листя і коріння взяли у контрольних і оброблених dsGUS рослин через 7 і 15 діб після проростання. РНК екстрагували із зібраних тканин і виконали ЗТ-ПЛР зі специфічними праймерами GUS (Таблиця 3). Додатково, ендогенний ген домашнього господарства кукурудзи (убіквітин) використовували в якості позитивного контролю при реакції ПЛР. Було встановлено, що молекули dsRNA GUS є виключно стабільними в обробленому насінні і можуть бути детектовані в рослинах кукурудзи через 7 і 15 діб після проростання насіння.

DsRNA GUS може бути детектована в саджанцях кукурудзи шляхом ЗТ-ПЛР через 7 і 15 діб після проростання відповідно до одного аспекту даного розкриття. Через один тиждень dsRNA GUS детектували в пагонах дев'яти з одинадцяти перевірених саджанців кукурудзи. DsRNA GUS не детектували у необроблених рослинах. Через 1 тиждень після проростання dsRNA GUS детектовані в п'яти з п'яти коренів оброблених саджанців кукурудзи через 1 тиждень після проростання. Через 15 діб після проростання dsRNA GUS були детектовані в коренях саджанців кукурудзи.

Молекули dsRNA GUS не інкорпорується в геном оброблених рослин кукурудзи через один тиждень після проростання, що було визначено електрофорезом на агарозному гелі при реакціях ПЛР на послідовності GUS.

Таблиця 3

Праймери для ПЛР-ампліфікації генів GUS і убіквітину і продукту dsRNA GUS.

Назва праймера	Послідовність праймера/SEQ ID NO:	Довжина праймера
GUS_T7_For	TAATACGACTCACTATAGGGAGATCGACGGCCTGTGGGCATTC/(SEQ ID NO:15)	
GUS_T7_Rev	TAATACGACTCACTATAGGGAGCATTCCCGGCGGGATAGTCTG/(SEQ ID NO:16)	43
GUS208For	CAGCGCGAAGTCTTTATACC/(SEQ ID NO:17)	43
GUS289Rev	CTTTGCCGTAATGAGTGACC/(SEQ ID NO:18)	20
zmaUBQ-947F	CCATAACCCTGGAGGTTGAG/(SEQ ID NO:19)	20
zmaUBQ1043R	ATCAGACGCTGCTGGTCTGG/(SEQ ID NO:20)	20
dsRNA GUS продукт	TAATACGACTCACTATAGGGAGATCGACGGCCTGTGGGCATTCAGTCTGGATCGCGAAACTGTGGAATTGATCAGCGTTGGTGGGAAAGCGCGTTACAAGAAAGCCGGGCTATTGCTGTGCCAGGCAGTTTAA CGATCAGTTCGCCGATGCAGATATTCGTAATTATGCGGGCAACGTCTGGTATCAGCGCGAAGTCTTTATACCGAAAGGTTGGGCGAGGCCA GCGTATCGTGCTGCGTTTCTGATGCGGTCACTCATTACGGCAAAGT GTGGGTCAATAATCAGGAAGTGATGGAGCATCAGGCGCGCTATAC GCCATTTGAAGCCGATGTCACGCCGTATGTTATTGCCGGGAAAG TGACGTATCACCGTTTGTGTGAACAACGAACTGAACTGGCAGACT ATCCCGCCGGGAATGCTC CCTATAGTGAGTCGTATTA/(SEQ ID NO:21)	

Приклад 5: мікроскопія флуоресценції послідовності siRNA в насінні різних рослин

Насіння рослин відповідно до протоколу, описаному в Прикладі 1. Насіння промивали протягом 4 годин при 20 °C, сушили при 25 °C і негайно обробили флуоресцентною siRNA (siGLO, кінцева концентрація 2 мкМ, компанія Thermo Scientific) при 15 °C протягом 24 годин. Якість siGLO перед застосуванням до насіння рослини перевірили аналізом електрофорезом на гелі. Детектували смуги, відповідні очікуваному розміру 20 - 24 пари основ молекул флуоресцентної siRNA.

Зображення флуоресценції насіння отримали через 24 - 48 годин після обробки,

використавши мікроскоп Olympus з найменшим збільшенням об'єктива (5X для більш великого насіння, такого як насіння рису і томата, і 10X для більш дрібного насіння, такого як насіння *Arabidopsis*). Для того, щоб усунути можливість неспецифічної автофлуоресценції, насіння, оброблені dsRNA, порівняли з контрольним необробленим насінням. Проникнення молекул флуоресцентної siRNA в насіння рослин спостерігали через 24 години після обробки насінини *Arabidopsis*, рису та томату siRNA в кінцевій концентрації 2 мкМ.

Проникнення молекул флуоресцентної siRNA в насіння рису спостерігалось через 24 години після обробки dsRNA siGLO.

Для того, щоб оцінити ефективність розподілу флуоресцентної siRNA всередині насіння, зробили зрізи насіння різних рослин і отримали їх зображення за допомогою флуоресцентного мікроскопа через 48 годин після обробки. Зображення кожної обробленої насінини виконували поруч із контрольною необробленою насіниною. Світлові і флуоресцентні зображення отримували для проб насіння рису, томату, огірка, квасолі, сорго і пшениці.

Проникнення молекул флуоресцентної siRNA в насіння рису спостерігалось через 48 годин після обробки dsRNA siGLO. Зробили зрізи обробленого siGLO і контрольного насіння рису, щоб розглянути внутрішній розподіл флуоресцентної dsRNA на флуоресцентному мікроскопі, і в обробленій насінині детектували молекули флуоресцентної siRNA. РНК флуоресцентної siGLO детектували в ендоспермі і зародку.

Проникнення молекул флуоресцентної siRNA в насіння томату спостерігалось через 48 годин після обробки dsRNA siGLO. Зробили зрізи обробленого siGLO і контрольного насіння томату, щоб розглянути внутрішній розподіл флуоресцентної dsRNA на флуоресцентному мікроскопі. РНК флуоресцентної siGLO була детектована в ендоспермі і зародку.

Проникнення молекул флуоресцентної siRNA в насіння огірка спостерігалось через 48 годин після обробки dsRNA siGLO. Зробили зрізи обробленого siGLO і контрольного насіння огірка, щоб розглянути внутрішній розподіл флуоресцентної dsRNA на флуоресцентному мікроскопі. РНК флуоресцентної siGLO була детектована в ендоспермі і зародку.

Проникнення молекул флуоресцентної siRNA було детектовано в зрізах насіння різних видів рослин, включаючи квасолю, томат, сорго і пшеницю, через 48 годин після обробки dsRNA siGLO. Зробили зрізи обробленого siGLO і контрольного насіння, щоб розглянути внутрішній розподіл флуоресцентної dsRNA на флуоресцентному мікроскопі. Світлові зображення також були отримані для кожної насінини і показані поруч із флуоресцентним зображенням насінини для довідки.

На Фіг. 1 представлені флуоресцентні зображення обробки siGLO насіння рису за період 24 години. Перевіряли вплив часу інкубації з dsRNA siGLO на інтенсивність флуоресценції, що зазначає кількість і якість проникнення dsRNA. Зображення контрольного насіння, що залишилося необробленим (1), були отримані разом із зображеннями насіння, обробленого dsRNA siGLO, для чотирьох періодів часу інкубації: 10 хв (2), 3,5 години (3), 5,5 годин (4) і 24 години (5).

Зрозуміло, що siRNA розподілена на різних рівнях між зародком і ендоспермом. Відповідно, молекули dsRNA надходять прямо в зародок. Без прив'язки до будь-якої теорії, молекули dsRNA транспортуються водним розчином, використовуваним для обробки насінини. Молекули dsRNA надходять в ендосперм як частина процесу абсорбції води ендоспермом. Потім ці молекули транспортуються в зародок, що розвивається, як частина потоку поживних речовин з ендосперму в зародок під час проростання і розвитку насінини.

Ці дані припускають, що молекули РНК, використовуваної для обробки насіння, проникають в зародок і функціонують в ньому при його розвитку, а також проникають в ендосперм і живлять зародок після проростання.

Приклад 6: Тимчасовий експеримент з siGLO-обробки

Тимчасовий експеримент виконали на насінні рису, щоб контролювати кінетику проникнення siGLO в насіння після обробки насінини (Фіг. 1). Результати показують, що siRNA ефективно проникає в насіння рослин за протоколом, який описаний в Прикладі 1.

Приклад 7: Обробка насіння проти генів *spodoptera littoralis*

Spodoptera littoralis (або *Prodenia littoralis*), також відома як гусінь, що харчується листям африканського або єгипетського бавовнику, є бабочкою, широко розповсюдженою в Африці та європейському Середземномор'ї. Вона є поширеним шкідником овочів, квітів та інших сільськогосподарських культур.

РНК екстрагували для продукції dsRNA з личинок *Spodoptera littoralis*, і бібліотека кДНК була приготована з 0,5 мкг сукупної РНК. Декілька генів (АТФаза, NADPH-(цитохром P450)-оксидоредуктаза (в даному документі має назву "NADPH"), інгібітор апоптозу (інгібітор апоптозних білків) і хітинсинтаза були обрані для перевірки впливу харчування *S. littoralis*

- рослинами, вирощеними з насіння, оброблених dsRNA, направленої проти цих генів (див. Таблицю 4). Насіння кукурудзи промивали протягом 4 годин, сушили при 30°C і відразу ж обробили молекулами dsRNA в кінцевій концентрації 40 мкг/мл (для інгібітора апоптозних білків і АТФази), 80 мкг/мл (для NADPH, 40 мкг/мл для кожної послідовності dsRNA, див. Таблицю 4)
- 5 або розчином суміші (80 мкг/мл кінцева концентрація), що містить всі три гени (20 мкг/мл для кожної з чотирьох послідовностей dsRNA) протягом 24 годин. Свіже насіння томату не промивали і відразу ж обробили молекулами dsRNA в кінцевій концентрації 66 мкг/мл (для інгібітора апоптозних білків), 133 мкг/мл (для NADPH) або розчином суміші (80 мкг/мл кінцева концентрація), що містить dsRNA, націлену на ці два гени, протягом 48 годин. Оброблене
- 10 насіння проростили і виростили з них рослини. Контрольне насіння, що не було оброблене dsRNA, направленої проти генів *S. littoralis*, а були інкубовані зі схожим розчином, або яким не містить dsRNA, або яким містить dsRNA,направлену проти неспорідненого гена, такого як GUS, проростили і вирощували поруч з обробленими рослинами. Листя оброблених і контрольних рослин помістили на чашки Петрі і використовували як єдине джерело харчування для *S.*
- 15 *littoralis* (зазвичай, приблизно 5 гусениць на одну чашку). Сукупна маса тіла гусениць реєструвалася на початку кожного експерименту і відстежувалася протягом його. При необхідності додавали нове листя, і їх масу також реєстрували. Збільшення маси тіла гусениць обчислювали і використовували як індикатор їх стану і виживання.

Таблиця 4

Послідовності генів *Spodoptera littoralis* для зниження активності і праймери, використані для покоління молекул dsRNA

Назва гена	Організм	SEQ ID NO
NADPH	<i>Spodoptera littoralis</i> мРНК NADPH-(цитохром P450)-оксидоредуктази, повний cds (JX310073.1)	21
АТФаза	<i>Spodoptera littoralis</i> H(+) - мРНК субодиниці В АТФази, частковий cds (AY169409.1)	22
Інгібітор апоптозних білків	<i>Spodoptera littoralis</i> мРНК для інгібітора апоптоза (ген IAP) (AM709785.1)	23
Хітинсинтаза	<i>Spodoptera exigua</i> мРНК хітинсинтази А, повний cds (DQ062153)	24
dsRNA№1 NADPH	<i>Spodoptera littoralis</i>	25
dsRNA№2 NADPH	<i>Spodoptera littoralis</i>	26
dsRNA№1 NADPH прям	<i>Spodoptera littoralis</i>	27
dsRNA№1 NADPH зворот	<i>Spodoptera littoralis</i>	28
dsRNA№2 NADPH прям	<i>Spodoptera littoralis</i>	29
dsRNA№2 NADPH зворот	<i>Spodoptera littoralis</i>	30
dsRNA№1 АТФази	<i>Spodoptera littoralis</i>	31
dsRNA№1 АТФази прям	<i>Spodoptera littoralis</i>	32
dsRNA АТФази№1 зворот	<i>Spodoptera littoralis</i>	33
dsRNA№1 IAP	<i>Spodoptera littoralis</i>	34
dsRNA№1 IAP прям	<i>Spodoptera littoralis</i>	35
dsRNA№1 IAP зворот	<i>Spodoptera littoralis</i>	36
dsRNA№1 хітинсинтази	<i>Spodoptera exigua</i>	37
dsRNA№2 хітинсинтази	<i>Spodoptera exigua</i>	38
dsRNA№1 хітинсинтази прям	<i>Spodoptera exigua</i>	39
dsRNA№2 хітинсинтази прям	<i>Spodoptera exigua</i>	40
dsRNA№2 хітинсинтази зворот	<i>Spodoptera exigua</i>	41
dsRNA№1 хітинсинтази зворот	<i>Spodoptera exigua</i>	42

20 Експеримент 1

- Гусениць *Spodoptera littoralis* помістили в чашки Петрі з листям кукурудзи від пророщеного контрольного або обробленого dsRNA насіння і щодня контролювали поїдання листя і збільшення маси тіла. Дані по збільшенню маси тіла *S. littoralis* через 24 години, 48 годин і 5 діб показані в Таблиці 5, відповідно. Відзначте негативний вплив на збільшення маси тіла гусениць,
- 25 що харчувалися листям, обробленого dsRNA, у порівнянні з гусеницями, що харчувалися контрольним необробленим. Збільшення маси тіла гусениць *S. littoralis*, що харчувалися контрольним листям, було нормалізовано до значення "1".

Експеримент 2

У цьому експерименті молекули dsRNA для сайленсінгу генів NADPH або IAP *S. littoralis* використовували для обробки насіння кукурудзи. Листя саджанців, вирощених з цього насіння, а також контрольне листя використовували як джерела їжі для 5 гусениць *Spodoptera littoralis* в одній чашці Петрі (дві чашки для кожної обробки). Контрольні листя обробили dsRNA, направленої проти гена GUS. Збільшення маси тіла реєстрували для контрольної та обробленої груп через 48 годин з початку експерименту (Таблиця 5). Найбільший вплив на збільшення маси тіла спостерігається у гусениць, що харчувалися листям, обробленим NADPH-dsRNA. Збільшення маси тіла *S. littoralis*, що харчувалися контрольним листям, було нормалізовано до значення "1".

Експеримент 3

У цьому експерименті молекули dsRNA для сайленсінгу генів NADPH або IAP *S. littoralis* використовували для обробки насіння томата. Також була виконана додаткова обробка насіння розчином суміші, що містить молекули dsRNA, націлені проти обох генів. Листя від саджанців, вирощених з цього насіння, а також контрольне листя використовували як джерела їжі для 5 гусениць *Spodoptera littoralis* в одній чашці Петрі. Збільшення маси тіла реєстрували для контрольної та обробленої груп через 72 години після обробки (див. Таблицю 5). Збільшення маси тіла *S. littoralis*, що харчувалися контрольним листям, було нормалізовано до значення "1".

Експеримент 4

У цьому експерименті молекули dsRNA для сайленсінгу генів NADPH, IAP або АТФази *S. littoralis* використовували для обробки насіння кукурудзи. Також була виконана додаткова обробка насіння розчином суміші, що містить молекули dsRNA, націлені проти всіх трьох генів. Листя від саджанців, вирощених з цього насіння, а також контрольне листя використовували як джерела їжі для 5 гусениць *Spodoptera littoralis* в одній чашці Петрі. На четвертий день оброблене листя кукурудзи було замінено необробленим листям салату в якості єдиного джерела їжі. Збільшення маси тіла реєстрували для контрольної та обробленої груп протягом періоду до 8 діб. Маса тіла всіх гусениць через 24 години використовували в якості контрольної точки, і збільшення маси тіла *S. littoralis*, що харчувалися контрольним листям, було нормалізовано до значення "1". Дані з відносного збільшення маси тіла гусениць, що харчувалися контрольним чи обробленим листям кукурудзи, представлені в Таблиці 5.

Таблиця 5

Збільшення маси тіла *Spodoptera littoralis* після харчування листями, обробленими dsRNA, через 24 години.

Експеримент	Час	Контроль	NADPH	IAP	Суміш	АТФаза	GUS
	24 години	1,0	0,64	0,38	Н/3	0,8	Н/3
1	48 годин	1,0	0,69	0,57	Н/3	0,7	Н/3
1	5 діб	1,0	0,36	0,84	Н/3	0,94	Н/3
2	48 годин	1,0	0,55	0,9			1,0
3	48 годин	1	0,55	0,9			
3	72 години	1	0,95	0,91	0,90		
4	5 діб ¹	1,0	0,76	0,73	0,99	1,11	
4	7 діб ²	1,0	0,88	0,87	0,89	0,91	
4	8 діб ³	1,0	0,9	0,78	0,97	1,12	

¹ Чотири доби - оброблена кукурудза і 1 добу - салат;

² Чотири доби - оброблена кукурудза і 3 доби - салат;

³ Чотири доби - оброблена кукурудза та 4 доби - салат.

Н/3 - Не застосовується.

Приклад 8: САЙЛЕНСІНГ ГЕНА PDS-1 В РИСІ СУМІШІ dsRNA/ siRNA

Насіння рису промивали у промивальному розчині протягом 4 годин при 20 °С, сушили при 25 °С і негайно обробили сумішшю dsRNA/siRNA в сукупній концентрації 5 мкг/мл при 15 °С. Насіння пророщували при кімнатній температурі протягом декількох діб і контролювали розвиток насінини. Насіння, оброблене PDS і сумішшю dsRNA/siRNA, показало уповільнений ріст і затриманий розвиток, що спостерігалось по саджанцям меншого розміру і зменшеному коренеутворенню. З міркувань ефективності та для того, щоб збільшити схожість об'єкта, що спостерігається, два продукти гена PDS-1 об'єднані (див. Таблицю 6).

Два продукта гена PDS-1 для сайленсінгу сумішшю dsRNA/siRNA.

Назва послідовності	Організм	Ідентифікаційний номер NCBI	SEQ ID NO
dsRNA1 PDS1 фітоїн-десатурази	Zea mays	BT084155.1	43
dsRNA1 PDS2 фітоїн-десатурази	Zea mays	BT084155.1	44

Цей експеримент виконали в трьох біологічних повторах, і результати представлені на Фіг. 2A-В.

Приклад 9: Знебарвлення хлорофілу і інгібування росту після сайленсінгу PDS

Насіння рису обробили відповідно до Прикладу 8 і контролювали їх подальший розвиток і ріст саджанців. Через 30 діб після обробки для сайленсінгу PDS-1 реєстрували загальний фенотип двох груп рослин, контрольної та з пригніченим PDS. Повідомлялося, що сайленсінг PDS викликає знебарвлення хлорофілу і інгібування росту (Peretz et al., 2007, Plant Physiol 145: 1251-1263), що корелюється з фенотипом рослин з пригніченим PDS у винаході. Оброблені рослини рису через 30 діб виглядали меншими за розміром і блідішими за кольором, відповідно, в порівнянні з контрольними рослинами.

Приклад 10: Детекція двох продуктів гена PDS-1 за допомогою плр у реальному часі

Після обробки сумішшю dsRNA/siRNA (співвідношення 1:1) відповідно до Прикладу 8 рівні експресії продуктів гена PDS-1 визначили за допомогою ПЛР в реальному часі, використовуючи спеціально розроблені праймери:

Прямий: GATTGCTGGAGCAGGATTAG SEQ ID NO: 45;

Зворотний: CCCTTGCCTCAAGCAATATG, SEQ ID NO: 46.

Для цілей нормалізації також визначили експресію UBQ5, використовуючи праймери:

Прямий - ACCACTTCGACCGCCACTACT, SEQ ID NO: 47;

Зворотний - ACGCCTAAGCCTGCTGGTT, SEQ ID NO: 48.

Результати показані на Фіг. 3A-C.

Приклад 11: Сайленсінг гена-мішені HAP2E

Насіння рису обробили за протоколом, описаним в Прикладі 1. Насіння промивали протягом 4 годин при кімнатній температурі, сушили протягом ночі при 25 °C і відразу ж обробили dsRNA Hap2e в концентрації 152 мкг/мл протягом 41 години при 15 °C (послідовність dsRNA Hap2e див. в Таблиці 7). Контрольні та оброблені dsRNA Hap2e насіння рису, які проросли через 5 діб після обробки, не показали будь-яких відмінностей у розвитку їх коренів. РНК екстрагували з пагонів пророслого насіння через 5 і 7 діб після проростання, і виконали ЗТ-ПЛР. Після перевірки 3 різних наборів праймерів (див. Таблицю 7), розташованих на різних ділянках молекули dsRNA (Таблиця 8, що показує кратну зміну відносно контролю), кращий набір праймерів (набір 3) використовували для оцінки рівнів експресії ендogenous Hap2e в рослинах, оброблених dsRNA, проти контрольних (необроблених) рослин. Зниження експресії мРНК Hap2e в оброблених рослинах на рівні понад 50% сайленсінгу в порівнянні з контрольними рослинами було досягнуто з ефективністю 31,25% (Таблиця 9).

Інші насіння рису обробили dsRNA Hap2e в концентрації 145,7 мкг/мл в тих же умовах. ЗТ-ПЛР з використанням випадкових праймерів + Oligo dT на РНК, екстрагованої з саджанців через 18 діб після проростання, також показала зниження експресії мРНК Hap2e в рослинах, оброблених dsRNA (Таблиця 10), на рівні 50% зниження експресії з ефективністю більше 25% у порівнянні з контрольними.

Таблиця 7

Праймери, використані для ЗТ-ПЛР молекули dsRNA Hap2e.

Набір праймерів	Розташування набору праймерів	Назва і напрямок праймеру	Послідовність праймера	SEQ ID No.:
1	В dsRNA	osaHAP2E501F3	ACCGGCATCAGCTCAGTCTC	49
		osaHAP2E589R3	TGCTGTTCTCTGGGCACAGG	50
2	В місці з'єднання	osaHAP2E11F5	TCCCCTCAGATATTAACAAC	51
		osaHAP2E108R5	AGGAGGAAAGGCAGCTTCTGTG	52
3	Поза dsRNA	osaHAP2E122F7	GTGACTCGTCACCAACAAAG	53
		osaHAP2E202R7	TGTGTTGTCCGTTGAGACTG	54

Таблиця 8

Оцінка праймерів при обробці насіння рису dsRNA Hap2e (мішень mir 169)

	Контроль	EM47766	EM47767	EM47769	EM47772	EM47773
Набір праймерів 1	1,0	0,87	0,7	-	0,81	0,62
Набір праймерів 2	1,0	0,99	0,82	-	0,89	0,44
Набір праймерів 3	1,0	0,76	0,73	-	0,78	0,4

Кратна зміна відносно необроблених контрольних рослин (контроль = 1.0)

5

Таблиця 9

Обробка насіння рису dsRNA Hap2e (мішень mir 169) через 7 діб

	Контроль	EM47796	EM47798	EM47799	EM47803	EM47804	EM47769
Відносна кратна зміна	1,0	0,41	0,77	0,52	0,47	0,83	0,0

Кратна зміна відносно необроблених контрольних рослин (контроль = 1.0)

Таблиця 10

Обробка насіння рису dsRNA Hap2e (мішень mir 169) через 18 діб.

Контроль	EM 49050	EM 49051	EM 49052	EM 49053	EM 49054	EM 49056	EM 49047	EM 49060	EM 49061	EM 49063	EM 49064
1,0	0,33	0,41	0,93	0,54	0,65	0,54	0,73	0,73	0,90	0,64	0,96

Кратна зміна відносно необроблених контрольних рослин (контроль = 1.0)

Приклад 12: Сайленсінг гена-мішені NFY у насінні кукурудзи

Насіння кукурудзи обробили за протоколом, описаним в Прикладі 1. Насіння промивали протягом 4 годин при кімнатній температурі, сушили протягом ночі при 30 °C і відразу ж обробили dsRNA NFY в концентрації 56 мкг/мл протягом 40 годин при 15 °C (послідовність dsRNA NFY див. в Таблиці 11). ЗТ-ПЛР на РНК, екстрагованої з контрольного і обробленого dsRNA NFY насіння кукурудзи через 10 діб після проростання була виконана для визначення рівня експресії гена-мішені NFY мішень (див. Таблицю 11). Зниження експресії гена було успішно досягнуто, що показано в Таблиці 12.

10

15

Таблиця 11

Праймери, використані для ЗТ-ПЛР молекул
dsRNA NFY в насінні кукурудзи 3 через 10 діб після проростання

Назва і напрямок праймеру	Послідовність праймеру	SEQ ID No.:
zma-NFYA3_345 F3	TCGGAAGCCGTACCTTCGTG	55
zma-NFYA3_442R3	CCTGGAGCTGCTGCTTTGTG	56
zma-NFYA3_457F4	TACCAGGCGTCGAGTGGTTC	57
zma-NFY-A3_542R4	GAAGAGGGCGTGCAAATGGG	58

Таблиця 12

Обробка насіння кукурудзи dsRNA NFY (мішень mir169).

Контроль	EM 48006	EM 48007	EM 48009	EM 48010	EM 48011	EM 48012	EM 48013	EM 48014
1,0	0,51	0,62	0,67	0,33	0,50	0,76	0,85	0,11

5 Кратна зміна відносно необроблених контрольних рослин (контроль = 1.0)

Приклад 10: Сайленсінг гена-мішені NFY в насінні томатів

Насіння томату обробили за протоколом, описаним в Прикладі 1. Насіння без промивання обробили dsRNA NFY в концентрації 200 мкг/мл протягом 24 годин при 15 °C, насіння двічі коротко промили і відразу ж висадили в ґрунт без сушіння. ЗТ-ПЛР на РНК, екстрагованої з 10 контрольного і обробленого dsRNA NFY насіння томата через 3 тижні після проростання, виконали для визначення рівня експресії гена-мішені NFY (див. Таблицю 13). Зниження експресії гена було успішно досягнуто, як показано в Таблиці 14.

Рослини томата через 55 діб після обробки молекулами dsRNA NFY порівняли з 15 контрольними рослинами того ж віку. При порівнянні були очевидні великі відмінності між фенотипами, найбільш помітним було зрушення у рості, причому оброблені рослини були значно коротшими необроблених контрольних рослин (Фіг. 4).

Таблиця 13

Праймери, використані для ЗТ-ПЛР молекул dsRNA NFY в томатах, і продукт dsRNA NFY

Назва послідовності	Послідовність	SEQ ID No.:
slyNFYA125F3	CTATTGCGTGTGCTCCAAAC	59
slyNFYA212R3	ACATGAGGAGGAACCAAAGG	60
Продукт 1 dsRNA NFY	CTAATACGACTCACTATAGGGAGAGGCTCAAGAACCAGTT TATGTTAATGCTAAGCAGTATCGAAGGATCCTGCAGCGAA GACAGTCACGTGCTAAAGCAGAACTTGAAGAAGCAAAT AAAGGGTAGAAAGCCATATCTTCACGAGTCTCGACATCAG CATGCACTGAGGAGGGTAAGGGCCTCGGGTGGACGTTTT GCCAAAAAGACAGATGCTTCTAAGGGTACTGGTTCTGTGA GTTTCATCGGGTTCTGAACCTTTGCAGTTCAATGCTGCTGA TATTCAAAAGAGGAATGAAAATGGAAGGTTGGCCGAGCTT CAGCAGTCTTATTCAAATGGTAGCAGTTATGGCAATCAAA GTAGCTTTCAAGAATCCAAGGATGAGTACCAGTTTGCTAA AAGCAGGGAAGGAGGTTTTTTGTCAAGTAATTGGAGATA CGTTCATGTGTAACTAGCTCTTGCCCTCTCCCTATAGTG AGTCGTATTAG	61

Продовження таблиці 13

Продукт 2 dsRNA NFY	CTAATACGACTCACTATAGGGAGAGCAGTTATGGCAATCA AAGTAGCTTTCAAGAATCCAAGGATGAGTACCAGTTTGCT AAAAGCAGGGAAGGAGGTTTTTTTGTCAAGTAATTGGAGA TACGTTTCATGTGTAACTAGCTCTTGCCCTGCAACGAGGG TAGAGTATGAGCAAGAGGAGTTTACAGGGATTGTTTCATT TCTTGGCTTTTCAAGATAGGCGGCAATTCATTCTTGGCTTT TTACTTTAGTGTTAAAGGGAGCAACAGAGGTGACGAGGGT ATCAGTGTTGCAGCATTTGCTTGGAGATTACATCTTCCCTT ATGTACAGAGATGGATGAACCTTAGAAGTATGATTAAGAAAG TTTTTCAGTAAGTTTATGTTTGGCCAGTTACTGTAGTTTTA GTTTAGGAGACCATGTAAAAAGGTTGTTAGTTTTGCAAAA GGATCTTTTTTCTTCCCTAATTGGTGCATTCTCCCTATAG TGAGTCGTATTAG	62
---------------------	--	----

Таблиця 14

Обробка насіння томату dsRNA NFY (мішень mir169) через 3 тижні

Рослина	EM 49778	EM 49812	EM 49816	EM 49818	EM 49819	EM 49826	EM 49827	EM 49829
Відносна кратна зміна	1,0	0,8	0,9	0,5	0,6	0,9	0,8	0,6
Рослина	EM 49832	EM 49833	EM 49834	EM 49835	EM 49836	EM 49837	EM 49838	EM 49839
Відносна кратна зміна	0,7	0,8	0,9	0,5	0,9	0,5	0,5	0,8

Кратне зміна відносно необроблених контрольних рослин (контроль = 1.0)

5 Приклад 11: Сайленсінг гена-мішені NAC у насінні кукурудзи

Насіння кукурудзи обробили за протоколом, описаним в Прикладі 1, насіння промивали протягом 4 годин при кімнатній температурі, сушили протягом ночі при 30 °C і відразу ж обробили dsRNA NAC в концентрації 90 мкг/мл протягом 40 годин при 15 °C і відразу ж проростили (послідовність dsRNA NAC див. у Таблиці 15). ЗТ-ПЛР на РНК, екстрагованої з

10 контрольного і обробленого dsRNA NAC насіння кукурудзи через 10 діб після проростання, була виконана для визначення рівня експресії гена-мішені NAC (див. Таблицю 15). Зниження експресії гена було успішно досягнуто, як показано в Таблиці 16.

Таблиця 15

Праймери, використані для ЗТ-ПЛР молекул dsRNA NAC в кукурудзі

Назва і напрямок праймеру	Послідовність праймеру	SEQ ID No.:
zmaNAC5_267F3	CGAGTCGGGATACTGGAAGG	63
zmaNAC5_342R3	CTTCTTCATGCCGACGAGGG	64
zmaNAC5_187F4	ACGATGGGCGAGAAGGAGTG	65
zmaNAC5_250R4	TCAGTCCCGTCGGGTAATTG	66

Таблиця 16

Обробка насіння кукурудзи dsRNA NAC (мішень mir164) через 10 діб після проростання

Рослина	Контроль	1	2	3	4	5	6	7
Відносна кратна зміна	1,0	0,22	0,14	0,22	0,20	0,43	0,16	0,55
Рослина	8	9	10	11	12	13	14	
Відносна кратна зміна	0,00	0,09	0,13	0,21	0,26	0,26	0,18	

Кратна зміна відносно необроблених контрольних рослин (контроль = 1.0)

Приклад 12: Сайленсінг гена-мішені ARF-8 в насінні рису

- Насіння рису обробили за протоколом, описаним в Прикладі 1, насіння промивали протягом 4 годин, сушили протягом ночі при 20 °C і відразу ж обробили dsRNA ARF-8 в концентрації 66,2 мкг/мл протягом 42 годин при 15 °C. ЗТ-ПЛР на РНК, екстрагованої з контрольного і обробленого dsRNA ARF-8 насіння рису через 18 діб після проростання, була виконана з метою визначення рівня експресії гена-мішені ARF-8 (див. Таблицю 17). Зниження експресії гена було успішно досягнуто, як показано в Таблиці 18 і Таблиці 19.

Таблиця 17

Праймери, використані для ЗТ-ПЛР молекули dsRNA ARF-8 кукурудзи і продукт dsRNA ARF-8

Назва послідовності	Послідовність	SEQ ID No.:
osaARF8_140F3	AGGGTCACATCCCGAACTAC	67
osaARF8_233R3	ACCTCGTCAGTCTCCACATC	68
osaARF8_1674F4	GTTGGATTGAGCTTCCTTC	69
osaARF8_1757R4	TGCTGCTGCTCACTAGCTAC	70
Продукт dsRNA ARF8	СТААТАСГАСТСАСТАТАГГГАГАСГАТССГТТГГССТАГТТССТ АТТГГАГАТСТГТААГГТТГГТТГГГАТГААТСААСТГСАГГГ ГАААГАССАССААГАТТТСТТТАТГГГАААТТААССАТТГАСА АСТТТТССААТГАТССАТСТГТТСССАСТГАГАТТААГСАТ ССТТГГАТТЦАГГАТТГСТТСССТГСАТГАТГАСГАСААТГСТ ТТААТГТГГСТГАГАГГАТТГСТГГТГАГГГАГГТТТЦАГТС ТСТГААСТТТЦАГТСАСТГГАТТГГСТССТГГГГАСААСГА ГГСТССАТССАТСТТАСТГАСГАСГАТСАСГАТСАГТАССАА ГСАГТАГТТГСТГСТГСТГСТТСССААТСТГГТГГТТАСТТА АААСГАСААТТСТТГСАСТТЦАГСААСТТАТГАСТСССТСАА ГААСАСТГСААСТСААСССТСТСССТАТАГТГАТСТГАТТАГ	71

Таблиця 18

Обробка насіння рису dsRNA ARF-8 (мішень mir167) через 18 діб після проростання

Рослина	Контроль	EM 48977	EM 48983	EM 48984	EM 48986	EM 48987	EM 48989
Кратна зміна	1,0	0,67	0,28	0,86	0,74	0,59	0,47

Кратна зміна відносно необроблених контрольних рослин (контроль = 1.0)

Таблиця 19

Обробка насіння рису dsRNA ARF-8 (мішень mir167) через 18 діб після проростання

Рослина	Кон- троль	EM 49194	EM 49196	EM 49198	EM 49200	EM 49201	EM 493203	EM 49204	EM 49206	EM 49209
Кратна зміна	1,0	0,44	0,88	0,45	0,22	0,26	0,12	0,06	0,31	0,92

Кратна зміна відносно необроблених контрольних рослин (контроль = 1.0)

Приклад 13: Сайленсінг гена-мішені SPL17 в насінні рису

Насіння рису обробили за протоколом, описаним в Прикладі 1, насіння промивали протягом 4 годин, сушили протягом ночі при 20 °C і відразу ж обробили dsRNA SPL17 в концентрації 200 мкг/мл протягом 41 години при 15 °C (послідовність dsRNA SPL17 дивиться в Таблиці 20). Контрольне та оброблене dsRNA SPL17 насіння рису, що проросло через 5 діб після обробки, не показало будь-яких візуальних відмінностей. РНК екстрагували з пагонів віком 5 діб цього пророслого насіння і виконали ЗТ-ПЛР, щоб визначити рівні експресії SPL17 в групах контрольних і оброблених рослин. Перевірили два різних набори праймерів (див. Таблицю 20), розподілені на різних ділянках молекул dsRNA (Таблиця 21). При виконанні ЗТ-ПЛР на РНК, екстрагованої з рослин віком 14 тижнів, було досягнуто зниження експресії мРНК SPL17 в оброблених рослинах з високою ефективністю в порівнянні з контрольними рослинами (Таблиця 22).

Таблиця 20

: Праймери, використані для 3Т-ПЛР
молекул dsRNA SPL17 в насінні рису через 5 днів після проростання

Набір і розташування праймерів	Назва послідовності	Послідовність праймера	SEQ ID No.:
1 – в dsRNA	osaSPL17_119F3	CTCAGCCATGGGATACTACC	72
	osaSPL17_189R3	GCTGGCCGTTGACGACATTG	73
2 – поза dsRNA	osaSPL17_55F4	ACCTCAGGTGGATGTCTC	74
	osaSPL17_151R4	TGCTGGTGCTTTGGGTAG	75

Таблиця 21

Обробка насіння рису dsRNA SPL17 (мішень miR156) через 5 днів після проростання

Рослина	Контроль	EM 47708	EM 47709	EM 47710	EM 47711	EM 47712
Набір праймерів 1	1	1,42	3,14	11,97	2,33	9,01
Набір праймерів 2	1	0,76	0,92	1	0,69	0,84

Кратна зміна відносно необроблених контрольних рослин (контроль = 1,0)

5

Таблиця 22

Обробка насіння рису dsRNA SPL17 (мішень miR156) через 14 тижнів після проростання.

Рослина	Контроль	EM 49502	EM 49503	EM 49511	EM 49513	EM 49515	EM 49517	EM 49519
Кратна зміна	1,0	0,085	0,141	0,27	0,337	0,275	0,129	0,321

Кратна зміна відносно необроблених контрольних рослин (контроль = 1,0).

Приклад 15: Сайленсінг мікро РНК генів-мішеней комплементарної dsRNA/siRNA

- Висока специфічність та ефективність посттранскрипційного сайленсінгу генів специфічної до гену-мішені dsRNA зробила його переважним способом створення переважного фенотипу еукаріотичних організмів, при цьому експресія одного або декількох генів знижується або вимикається. Специфічні послідовності dsRNA, призначені для сайленсінгу генів-мішеней мікроРНК кукурудзи (*Zea mays*) і рису (*Oryza sativa*). Більш конкретно, будуть використані мікроРНК, які, як відомо, асоціюються з підвищеною толерантністю до абіотичних стресів. У Таблиці 23, нижче, представлені кілька прикладів послідовностей генів-мішеней, які продуковані із використанням ПЛР-ампліфікації, щоб перевірити здатність до сайленсінгу генів сумішшю їх dsRNA/siRNA. Ці молекули dsRNA потім будуть використані для нокдауну ендogenous рівня обраних генів-мішеней.

Таблиця 23

Послідовності генів-мішеней і праймери для ПЛР

Назва послідовність	Організм	SEQ ID NO
miR169/NFY-A3	<i>Zea mays</i>	76
miR169/NFY-A3 прямий	Штучна послідовність	77
miR169/NFY-A3 зворотний	Штучна послідовність	78
miR169/NFY-A3 прямий	Штучна послідовність	79
miR169/NFY-A3 зворотний	Штучна послідовність	80
HAP2	<i>Oryza sativa</i>	81
HAP2 прямий	Штучна послідовність	82
HAP2 зворотний	Штучна послідовність	83
HAP2 прямий	Штучна послідовність	84
HAP2 зворотний	Штучна послідовність	85
miR156/SPL17	<i>Oryza sativa</i>	86

miR156/SPL17 прямий	Штучна послідовність	87
miR156/SPL17 зворотний	Штучна послідовність	88
miR156/SPL17 прямий	Штучна послідовність	89
miR156/SPL17 зворотний	Штучна послідовність	90
miR156/SBP-A3 HQ858696.1	<i>Zea mays</i>	91
miR156/SBP-A3 прямий	Штучна послідовність	92
miR156/SBP-A3 зворотний	Штучна послідовність	93
miR156/SBP-A3 прямий	Штучна послідовність	94
miR156/SBP-A3 зворотний	Штучна послідовність	95
miR164/NAC NM_001064881.1	<i>Oryza sativa</i>	96
miR164/NAC прямий	Штучна послідовність	97
miR164/NAC зворотний	Штучна послідовність	98
miR164/NAC прямий	Штучна послідовність	99
miR164/NAC зворотний	Штучна послідовність	100
NAC5 NM_001154298.1	<i>Zea mays</i>	101
NAC5 прямий	Штучна послідовність	102
NAC5 зворотний	Штучна послідовність	103
NAC5 прямий	Штучна послідовність	104
NAC5 зворотний	Штучна послідовність	105

Приклад 16: Сайленсінг гену ARF-8 в насінні томатів

- 5 Насіння томату обробили за протоколом, описаним в Прикладі 1, непромите насіння обробили dsRNA ARF-8 в концентрації 200 мкг/мл протягом 24 годин при 15 °C і відразу ж висадили в ґрунт. Рівні експресії гена досліджували, використовуючи ЗТ-ПЛР, через 3 і 8 тижнів після обробки (див. Таблицю 25). Зміни в експресії були досягнуті в рослинах, оброблених dsRNA, через 3 тижні після обробки (Таблиця 24).

Таблиця 24

Обробка насіння томату dsRNA ARF-8
(мішень mir167) через 3 тижні і 8 тижнів після проростання

Рослина	Контроль	ЕМ 49933	ЕМ 49950	ЕМ 49951	ЕМ 49952
3 тижні	1,0	0,6	0,6	0,5	0,8
Рослина	ЕМ 49953	ЕМ 49954	ЕМ 49955	ЕМ 49957	
3 тижні	0,8	0,5	0,6	0,9	
Рослина	Контроль	ЕМ 50374	ЕМ 50377	ЕМ 50378	ЕМ 50379
8 тижнів	1,0	0,97	0,68	0,98	0,68
Рослина	ЕМ 50381	ЕМ 50383	ЕМ 50398	ЕМ 50399	ЕМ 50402
8 тижнів	0,60	0,69	0,47	0,99	0,47

Кратна зміна відносно необроблених контрольних рослин (контроль = 1.0)

- 10 Рослини, які обробили молекулами dsRNA, специфічними для гена ARF8, показали фенотипічну відмінність в порівнянні з контрольними рослинами. Ця фенотипічна відмінність спостерігалася в різні моменти часу (55, 62 і 72 діб) і проявлялася як зниження висоти (Фіг. 5A-С), при цьому середня висота контрольних рослин становила ~ 36 см, висота рослин, оброблених dsRNA, становила, в середньому, ~ 30 см (Фіг. 5D). На додаток до їх меншої висоти (затримка розвитку по вертикалі), рослини, оброблені dsRNA, виявилися більш гіллястими (збільшення розвитку по горизонталі) в порівнянні з контрольними рослинами. Таким чином, рослини, оброблені dsRNA, специфічної для ARF8, були коротшими і більш гіллястими в порівнянні з їх контрольними зразками через 55 і 72 діб після обробки.

Таблиця 25

Праймери, використані для ЗТ-ПЛР молекул dsRNA ARF-8 у томата і продукт dsRNA ARF-8

Назва послідовності	Послідовність	SEQ ID No.:
slyARF_8_1816F4	CCTCAACAGTCCTGGATGTC	106
sly ARF_8_1896R4	CCCGTAAGTTGGAAGTGATG	107
Продукт 1 dsRNA ARF 8	СТААТАСГАСТСАСТАТАГГГГАГАГСТТСТССТССТАСТААСТГТГ ТСТААСГТСГСТАСТАСТААТТАТГАТГТГАТАТАССТСТАТГСС АСТАГГГАСТТСТГГАТТТССГААТСССТТГАТАГТТАТГТГСААГ АТТСТАСТГАСТТГТТГСАТААТГТАГГГСААГСТГАТГСАААСТ ГТГССССТГАСТАТТТГТСААГГТТАСАААТСАГСГТСССТТГГГА ГГТКАТТГГАСТАСТАСТСГГТТАААСТАСТАТКАТГАСТГСГАА ГГААТТАГГГСАГАТГТТСГГТАТЦГААГГГТТГСТТГААГАСССТ СААГАТСАГГСТГГСАГСТТГТАТТТГТТГАСАГГГААТГАТГ ТССТТСТССТТГГАГАСТАТССГТГГГГАААТТТГТСААТАА ТГТТТГГАСТАСТАААТТСТТТСАСССГААГТГТГСАААСТГ ГГГАААГААГГГТТГГАТСССТСТССТСТАТАГТГАТГТГАТТАГ	108
Продукт 2 dsRNA ARF 8	СТААТАСГАСТСАСТАТАГГГГАГАТГГГГАТТГАГССТТТГАСТА СТТТТССГАТГАТАССТАТСТТТТТСТССТААГГСТАААГААГССТ ТТСТАТАААГГААСТКАСТТАТКААГАТАГАТААСТААГАСТАТ ТААТЦГААТГТКАТГГТТААГААГГГААТГТГТТГАСТАГААСТА КАТТААТААТСТТКАГТСТТТТГГКАТГТТСТТТГГАТГСААСТА ГАГАТГСАТТААСТААТТСТССТАААТГАТАТААСТАКАСТАТАТ ААГСТАТГТГГСТАСТГГСТТГСАААГТТТТГГГАТГГГАТТТ АСТГАААСТАГААТТААТГСАГТТТКАГСАГССТГТССААТАТСТГ ААСТАГСААГТАСТГАГААТТААТТТТГКАТКАГСАГСАГСАГСА ГСАГСАГСАААТААТГСАГСААГСАГТТКАТКАГСАТАТГТГССТ ГТСТАААСССААТГТГТКАГАААСТТТАААГГСААТСССАГСА АТКААТССАТСТС ССТАТАГТГАТГТГАТТАГ	109

Приклад 17: Сайленсінг гену FW2.2 в насінні томатів

Насіння томату обробили за протоколом, описаним в Прикладі 1, непромите насіння обробили dsRNA FW2.2 в концентрації 100 мкг/мл протягом 24 годин при 15 °C і відразу ж висадили в ґрунт. Рівні експресії гена досліджували, використовуючи ЗТ-ПЛР, через 9 тижнів після проростання (праймери вказані в Таблиці 26). Було детектоване приблизно дворазове зниження рівня експресії FW2.2 в рослинах, оброблених dsRNA, у порівнянні з контрольними рослинами (Фіг. 6).

Навіть у такому випадку рослини, які обробили молекулами dsRNA, специфічної для гена FW2.2, не показали фенотипічних відмінностей в порівнянні з контрольними рослинами, що прибирає токсичний ефект як альтернативне пояснення фенотипічних ефектів з Прикладу 15. Рослини мали схожу висоту і зовнішній вигляд через 72 діб після обробки.

Приклад 17: Зниження експресії гену DELLA в рисі призводить до більш розвинутих коренів у пророслого насіння

Насіння рису обробили за протоколом, описаним в Прикладі 1, насіння промивали протягом 4 годин, сушили протягом 24 годин при кімнатній температурі і відразу ж обробили dsRNA DELLA в концентрації 66 мкг/мл протягом 36 годин при 15 °C. Насіння рису обробили dsRNA, направленої проти гена Della (див. Таблиця 28), який є відомим репресором росту рослини. Саджанці Arabidopsis з геном-мутантом Della більші і мають довшу кореневу систему (Josse, EM, Gan, Y., Bou-Torrent, J., Stewart, KL, Gilday, AD, Jeffree, CE, Vaistij, FE, Martínez-García, JF, Nagy, F., Graham, IA, and Halliday, KJ (2011). A DELLA in disguise: SPATULA restrains the growth of the developing Arabidopsis seedling. Plant Cell 23: 1337-1351.). На Фіг. 7 показана імітація фенотипів Arabidopsis з використанням насіння, обробленого dsRNA, при цьому оброблені саджанці більші і мають більш довше коріння ніж контрольні саджанці.

Продовження таблиці 27

Продукт dsRNA NRR	2	СТААТАСГАСТСАСТАТАГГГГАГАСАТГГГАААГТССГСААТССААГА ГАСАТТТТСТГААСТГСТГГАСГТСААГАТТСТТАТГСТГСААСТГГА АГАГТТСССТАГГГГАААСССААГТАСААСТАССГГССАТГГГАААГГ АГААГССАТСАГТТСТГААТГТТГТТСАСТССАГААААГТГТСАГТТС ТГГГТГССТСААСТСАГСТГАТТГГАТСААТГГАССАГССАГГССАА АСТТСТГГАСТТССААГГАТТГГАСТТТГАГАСАГСГТТТГГГТТГА ГГАГГГСАТАСАГССААГГААГАСАТТСАГААТСТТГГАСТАГСАСС ССТСАСССГГГААСТСАГГАААСГСТСААТТАГСАТСТТГСАГААГ ГСТТГТААССАТСАГТГАСТГАААТСТГААГАААГГААГСАГААГСТ АТСТАГГТАСАГАААГААГААГГТААГАГАААСТТТГГСАГАААГАТ СААГАТГСТТГСАГГААГГСТСТСТСССТА ТАГТГАГТСГТАТТАГ	114
-------------------	---	---	-----

Таблиця 28

Праймери, використані для аналізу шляхом ЗТ-ПЛР
на рівень експресії генів Hap2e, Della і SQS і продукти dsRNA

Назва послідовності	Послідовність	SEQ ID No.:
osaHAP2E122F7	GTGACTCGTCACCAACAAAG	115
osaHAP2E202R7	TGTGTTGTCCGTTGAGACTG	116
osaDella1410F5	CAGTTCGCGCACACCATTCG	117
osaDella1494R5	GCAGCATGAACGGCTCCAAG	118
osaSQS465F3	TCCGCAATGCCGTGTGCATC	119
osaSQS543R3	GCGGCAGGAATGCTAGTGTC	120
Продукт dsRNA Della	СТААТАСГАСТСАСТАТАГГГГАГАСАТГГГАААГТССГСААТССААГА ТГССССТАСТСААГТТГССССТТТСАССГСААТСААГС САТСТСАГГГТТТГСССГГСТГССАССГСГТССАГТСГ ТСАСТТГССАТСААГСАГГГГАТГСААТГГССАГСТСТС СТСАГГСССТГССССТТГТГСССГГСГСССССССАТСГТТ ССГССТСАССГСГТГССССССССГСАГССГГАСГААСС ГАСГССТТГСАГСАГГТГГГТТГГААГСТТГСССАГТТСГС ГСАСАСТТТГСГТГСАСТТТСАГТАССГГГГАСТСГТСГ ССГСАСТТТГСГГГАСТТГГАГССГТТСАТГСТГСАГССГ ГАГГГСГАГГСГГАСГСААСГААГГАСГТТГАГГТГАТС ГССГТСААСТСГГТГТТГСАГСТГСАССГГСТГСТСГСГС АГСССГГСГСГСТГГАГААГГТСТТГГГСАСГГТГСАСГС ГГТГСГГССААГГАТСГТСАССГТГГТАГАТСТССТТАТА ГТГАГТСГТАТТАГ	121
Продукт 1 dsRNA SQS	СТААТАСГАСТСАСТАТАГГГГАГААТАТСТАААССГСГАСТ ГГСАТТАТТСАТГТГГААААААГАСТАСААТТАСТГАТГГ АТААГТТТГСССТТГТСТСАССГСТТТСТТГГАГСТТГГТС ААГГТТАТСААГАГГСААТТГААГАААТСАТАГГСТААТГГ ГАСГАГААТГГСАААТТТАТСТГСААГГАГГТТГАААСТ ГТТГАТГАСТААТГАГТАСТГТСАСТАТГТАГСАГГГСТА ГТГГГГТАТГГГСТТТТСАГГСТТТТСАТГСТГГТГГГАС ГГААГАТСТГГСТТСАГАТТСАСТТТСАААТТСАТГГГСТТ ГТТТТГСАГААААТСААТААТТАГГГАТТАТТГГАГГА САТАААСГАГАТАССАААГТСАСГАТГТТТГГСССТСАГА ААТАТГГАГТАААТАТГТСААТАААСТСАГГАТТТГАААТАС ГАГГААААТТСАГААААГГСАГТТСАГТГТТТГААТГАТАТГ ГТГАСТААСГСТСТГТСТСАТСТССТТАТАГТГАГТСГТАТ АГ	122

Продовження таблиці 28

Продукт 2 dsRNA SQS	СТААТАСГАСТСАСТАТАГГГГАСГСТСТГТСТСАТГСТГА АГАСТГССТССАТАСАТГТСАГСАТТГААГГАТСАТГССАТ ТТТССГТТТТТГТГСААТАССТСАГАТААТГГСААТТГГГАС АТГТГСТАТТТГТТАСААТААТГТГААТГТСТТТАГАГГАГТТ ГТТААГАТГАГГСГТГГГСТСАСТГСАСГАГАТТАТТГАТГА ГАСАААСАСААТГТСАГАТГТСТАТСТГСТТТСТАТГАГТТ СТСТТСГСТГАТАГААТЦГААГАТТГАТААТААТГАТССААТ ГСТТСССТААССГСГГАААСГТГТТГАТГСГАТАААГАГАААС СТГСААГТСАТСТТГСТСАСТАААГАГААГГГГАТСАГАТТТ ГГАГААГТСАААГАТАСААСТСАТГСТГАТААТГГТТГТАСТ ТСТГТТГГТГГСТСТСССТАГАТГАТГСАТТА	123
---------------------	---	-----

Таблиця 29

Одночасний нокдаун експресії в насінні рису через 18 діб після проростання

PHK	Кон-троль	EM 49174	EM 49175	EM 49177	EM 49178	EM 49179	EM 49180
Hap2e	1,0	0,19	0,20	0,53	0,88	0,28	0,14
Della	1,0	0,14	0,10	0,47	1,00	0,42	0,10
SQS	1,0	0,15	0,01	0,23	0,71	0,42	0,27
PHK	EM 49181	EM 49183	EM 49184	EM 49185	EM 49186	EM 49187	EM 49188
Hap2e	0,06	0,27	0,92	0,24	0,27	0,29	0,37
Della	0,01	0,14	0,60	0,27	0,29	0,37	0,16
SQS	0,56	0,08	0,87	0,49	0,09	0,13	0,10

Кратна зміна відносно необроблених контрольних рослин (контроль = 1.0)

5 Приклад 20: Створення молекул dsRNA для сайленсінгу гену-мішені фітопатогену

Молекули dsRNA, що кодують гени *S. littoralis*, проаналізували проти геномів кукурудзи та томата (Фіг. 9 і 10, відповідно), використовуючи пошуки BLAST з наступними параметрами: поріг очікування - 10; розмір слова - 11; оцінка співпадання/неспівпадання 2-3; вартості гепів: існування: 5 подовження: 2; максимальні співпадання в діапазоні запиту: 0, пошуки BLAST були виконані на базах даних послідовностей кукурудзи (*Zea mays* - taxid: 4577) та томата (*Solanum lycopersicum* taxid: +4081), які відповідають викладеному в даному винаході.

10 Приклад 21: Обробка насіння проти гену NADPH SPODOPTERA LITTORALIS

Насіння кукурудзи (вар. 01DKD2) обробили молекулами dsRNA (SEQ ID No. 26), що має нуклеотидну послідовність, яка по суті ідентична або по суті комплементарна до щонайменше 18 суміжних нуклеотидів гена NADPH *S. littoralis*, відповідно до протоколу, описаному в Прикладі 1. Використовували dsRNA в кінцевій концентрації 80 мкг/мл, розбавлену 0,1 мМ ЕДТА. Обробку виконали шляхом обережного збовтування насіння в розчині протягом 3,5 годин в темній камері для росту при 15 °С. Після обробки насіння висадили в ґрунт і вирощували приблизно при 25 °С зі світловим періодом 16 годин. Рослини при необхідності поливали водопровідною водою.

Через 28 діб після обробки насіння листя оброблених і контрольних рослин помістили в чашки Петрі і використовували в якості єдиного джерела їжі для *S. littoralis*. Для кожної рослини використовували 15 личинок (5 личинок на одну чашку, три чашки на одну рослину). Перевірили п'ять рослин для кожної обробки насіння (NADPH, ЗФБ і ЕДТА). При необхідності додавали нове листя. Масу тіла кожної личинки реєстрували через 12 діб після початку годування і використовували як показник їх стану і виживання. Спостерігався значний (односторонній дисперсійний аналіз ANOVA, p -значення = $8,36 \times 10^{-5}$) негативний вплив на масу тіла личинок, що харчувалися рослинами, обробленими dsRNA NADPH, в порівнянні з личинками, що харчувалися контрольними рослинами. Дивіться Таблицю 30. Середня маса личинок, що харчувалися рослинами, обробленими NADPH, була на 23% і 20% менше ніж середня маса личинок, що харчувалися рослинами, обробленими ЗФБ і ЕДТА, відповідно.

Таблиця 30

Середня маса (мг) *Spodoptera littoralis* після 12 діб годування обробленими рослинами

Проба	1	2	3	4	5	Середнє	Станд. відх.
ЕДТА	40,8	46,7	45,3	38,9	47,1	43,8	3,7
ЗФБ	42,9	41	47,3	48,9	49,2	45,9	3,7
si-NADPH №1	38,5	26,8	32,5	35,2	43,2	35,2	6,2

Через 73 діб після обробки насінини листя оброблених і контрольних рослин знову використовували в якості єдиного джерела їжі для *S. littoralis*. У експеримент з годування було включено п'ять рослин з кожної групи. Листя кожної рослини помістили в п'ять чашок Петрі з п'ятьма личинками в кожній, тобто, 25 личинок на одну рослину і 125 личинок в одній групі. Через сім діб експерименту неочікувано велику кількість личинок знайшли мертвими в контрольній групі на ЕДТА. Через велику кількість смертей у контрольній групі вплив харчування тканиною рослини, взятої через 73 діб після dsRNA-обробки насінини, на стан і виживання *S. littoralis* далі не аналізували.

Визначили рівні експресії NADPH в підгрупах личинок, що харчувалися рослинами, вирощеними з насіння, обробленого молекулами dsRNA, націленими на NADPH або ЗФБ (28 діб після обробки насінини).

Таблиця 31

Личинки, з яких екстрагували РНК

Обробка	Джерело листя		Маса (мг)
	Кількість рослин	Повтори	
NADPH	2	2	22
			29
			15
			35
			18
	3	3	36
			28
			32
			30
			39
		2	29
			28
ЗФБ	1	2	37
			49
			33
			27
			37
	2	3	28
			40
			26
			39
			31
		2	34
			39

Повну РНК екстрагували з личинок, і приготували кДНК, використовуючи оліго-dT праймери, і рівень експресії мРНК NADPH *S. littoralis* визначили для личинок на оброблених і контрольних рослинах шляхом ПЛР в реальному часі (ЗТ-ПЛР) за допомогою барвника SYBR Green (компанія Quanta BioSciences), використовуючи гени домашнього господарства актин і EF1 α в якості нормалізаторів. Послідовності праймерів, використаних в ЗТ-ПЛР показані в Таблиці 32.

Праймери, використані для ЗТ-ПЛР-аналізу на рівень експресії NADPH

Назва і направлення праймера	Послідовність праймера	SEQ ID No.
NADPH_F	ATGGCTGTTGACGTAAGG	125
NADPH_R	TGCAGCTTCAGCTTCTGTG	126
EF1 α _F	ACCGTCGTAAGGTAATCC	127
EF1 α _R	TGGCGGCATCTCCAGATTTG	128
Актин_F	CTGGTCGTACCAACCGGTAT	129
Актин_R	GCAGAGCGTAACCTTCGTAG	130

Ніякої істотної зміни в рівнях експресії NADPH (критерій Уїлкоксона, р-значення > 0,05) не спостерігалось при аналізі шляхом ЗТ-ПЛР личинок, що харчувалися рослинами, вирощеними з насіння, обробленого молекулами dsRNA, націленими на NADPH або ЗФБ (28 діб після обробки насінини).

Приклад 22: Обробка насіння проти гену АТФази *SPODOPTERA LITTORALIS*

Насіння кукурудзи обробили відповідно до протоколу, описаному в Прикладі 1, молекулами dsRNA, що мають нуклеотидну послідовність, яка по суті ідентична або по суті комплементарна до щонайменше 18 суміжних нуклеотидів гена АТФази *S. littoralis* (SEQ ID No. 31). Коротко, насіння промили двічі дистильованою водою (ДДВ) перед обробкою протягом чотирьох годин. Потім насіння сушили при 30 °C протягом ночі. Після етапу сушіння використовували dsRNA, розбавлену 0,1 мМ ЕДТА, в кінцевій концентрації 53 мкг/мл. Обробку виконали шляхом обережного збовтування насіння в розчині протягом 26 годин в темній камері росту при 15 °C. Після обробки насінини пророщували на вологому папері протягом семи діб і потім висадили в ґрунт і вирощували приблизно при 25 °C зі світловим періодом 16 годин. Рослини при необхідності поливали водопровідною водою. Насіння, які обробили схожим розчином, що не містить dsRNA, проростили і вирощували в якості контрольних (ЕДТА-контроль) поруч з обробленими рослинами.

Через 43 діб після обробки насінини листя оброблених і контрольних рослин використовували в якості єдиного джерела живлення для *S. littoralis*. Рослина № 1 служила в якості джерела живлення для 20 личинок, поміщених в коробку розмірами 130 x170 мм. Рослина № 2 служила в якості джерела живлення для 15 личинок, поміщених в коробку розмірами 124x95 мм. Рослина № 3 служила в якості джерела живлення для 8 личинок, поміщених в чашку Петрі. Поверхня всіх коробок і планшетів була покрита вермикулітом, і нове листя додавали в міру необхідності. Смертність і масу тіла личинок відстежували протягом експерименту. На Фіг. 11А показана смертність, і на Фіг. 11В показана середня маса живих личинок *S. littoralis* через вісім діб з початку годування. Личинки, що харчувалися рослинами 1 і 3, вирощеними з насіння, обробленого dsRNA АТФази, набрали зіставну масу і показали схожу смертність з такими у контрольній групі, а личинки, що харчувалися рослиною № 2, вирощеною з насінини, обробленої dsRNA АТФази, були майже в 3 рази меншими ніж у контрольній групі, в якій смертність була вищою.

Для перевірки сталості ефектів обробки насінини dsRNA листя рослини № 2 зібрали через 85 діб після обробки насінини і використовували в якості єдиного джерела харчування для *S. littoralis*. Використовували всього 15 личинок в трьох чашках Петрі, що містять по п'ять личинок кожна. На Фіг. 11С показаний відсоток мертвих личинок через три доби після початку експерименту. У групі обробки dsRNA АТФази 12 з 15 личинок були мертві, а в контрольній групі мертвих личинок не було.

Сталість ефектів обробки насінини dsRNA була потім перевірена шляхом збору листя рослин № 1 і 2 через 91 добу після обробки насінини і використання цього листя в якості єдиного джерела їжі для *S. littoralis*. Кожною рослиною харчувалися всього 15 личинок в трьох чашках Петрі, які містили по п'ять личинок кожна. Через чотири доби експерименту обом групам також дали рослину № 3. На Фіг. 11D показаний відсоток мертвих личинок через сім діб після початку годування в порівнянні з контрольною групою.

Приклад 23: Обробка насіння проти генів АТФази, IAP і NADPH *SPODOPTERA LITTORALIS*

Рослини, описані в цьому Прикладі, обробили молекулами dsRNA, що мають нуклеотидну послідовність, яка по суті ідентична або по суті комплементарна до щонайменше 18 суміжних нуклеотидів гена АТФази, IAP або NADPH *S. littoralis*, і є тими ж рослинами, які описані в Прикладі 7.

Через 67 діб після обробки насінини листя оброблених і контрольних рослин, описаних у Прикладі 7, використовували в якості єдиного джерела живлення для *S. littoralis*. Одна рослина від кожної

5 обробки служила в якості джерела живлення для 10 личинок, поміщених в чашку Петрі. Поверхня планшетів була покрита вермикулітом. На Фіг. 12 показаний відсоток мертвих личинок через сім діб годування.

Приклад 24: Обробка насіння проти гену EF1α SPODOPTERA LITTORALIS

Насіння кукурудзи обробили молекулами dsRNA, що мають нуклеотидну послідовність, яка по суті ідентична або по суті комплементарна до щонайменше 18 суміжних нуклеотидів гена EF1 α *S. littoralis* (Таблиця 33) відповідно до протоколу, описаному в Прикладі 1. Коротко, насіння кукурудзи перед обробкою промивали двічі дистильованою водою (ДДВ) протягом чотирьох годин. Потім насіння сушили при 30 °C протягом ночі. Після етапу сушіння використовували dsRNA, розбавлену 0,1 mM EDTA, в кінцевій концентрації 132 мкг/мл. Обробку виконали шляхом обережного збовтування насіння в розчині протягом 26 годин в темній камері росту при 15 °C. Після обробки насіння пророщували на вологому папері протягом семи діб і потім висадили в ґрунт і вирощували приблизно при 25 °C зі світлом періодом 16 годин. Рослини в міру необхідності поливали водопровідною водою. Насіння, яке обробили схожим розчином, що не містить dsRNA, проростили і вирощували поруч з обробленими рослинами в якості контрольних (EDTA-контроль).

Через 43 доби після обробки насінини листя оброблених і контрольних рослин використовували в якості єдиного джерела живлення для *S. littoralis*. Рослина № 1 служила в якості джерела живлення для 20 личинок, поміщених в коробку 130x170 мм. Рослина № 2 служила в якості джерела живлення для 15 личинок, поміщених в коробку 124 x 95 мм. Рослина № 3 служила в якості джерела живлення для 8 личинок, поміщених в чашку Петрі. Поверхня всіх коробок і планшетів була покрита вермикулітом, і нове листя додавали в міру необхідності. Смертність і масу тіла личинок відстежували протягом усього експерименту. Через вісім діб після початку експерименту з годування вісім личинок з 43 були знайдені мертвими в групі обробки проти EF1 α , і три з 43 личинок були мертві в контрольній групі. На Фіг. 13А показана середня маса живих личинок *S. littoralis* через вісім діб після початку годування.

Через 87 діб після обробки насінини листя рослин № 2 і 3 використали вдруге в якості єдиного джерела живлення для *S. littoralis*. Всього 15 личинок в трьох чашках Петрі, що містять по п'ять личинок кожна, харчувались кожною рослиною, обробленою проти EF1 α , і двома контрольними рослинами (рослини № 3 і 6). На Фіг. 13В показаний відсоток мертвих личинок через п'ять діб після початку експерименту.

Таблиця 33

dsRNA, отримані з гена EF1 α *S. littoralis*

Назва послідовності	Послідовність	SEQ ID No.:
dsRNA №1 EF1α	CTAATACGACTCACTATAGGGAGAATGCCCTGGTTCAAGGGATGG AACGTTGAGCGCAAGGAAGGCAAGGCTGAAGGTAATGCCTCATT GAGGCCCTCGACGCCATCCTGCCCCCTGCTCGCCCCACAGACAA GCCCCCTGCGTCTTCCCTCCAGGACGTATACAAAATCGGTGGTAT TGGTACGGTGCCCGTAGGCAGAGTTGAAACTGGTATCCTCAAGCC TGGTACCATCGTCGTCTTCCGCCCCGCCAACATCACCCTGAAGT CAAGTCTGTGGAGATGCACCACGAAGCTCTCCAAGAGGCCGTAC CCGGTGACAACGTTGGTTTCAACGTAAAGAACGTTTCCGTCAAGG AGTTGCGTCGTGGTTACGTCGTGGTGA CTCCAAGAACAACCCAC CCAAGGGCGCCGCCGATTTACAGCACAGGTCATCGTGCTCAAC CACCCTGGTCAAATCTCAAACGGATACACACCTGTGCTGGATTGC CACACAGCCCACATTGCCTGCAAGTTCGCTGTCTCCCTATAGTGA GTCGTATTAG	131

Продовження таблиці 33

dsRNA №2 EF1α	CTAATACGACTCACTATAGGGAGAGGGCCAGGAAATGGGTAAGG GTTCCCTTCAAATACGCCTGGGTATTGGACAACTGAAGGCTGAGC GTGAACGTGGTATCACCATTGATATTGCTCTGTGGAAGTTTGGAAA CCGCTAAATACTATGTCACCATTATTGACGCTCCCGGACACAGAG ATTTTCATCAAGAACATGATCACTGGAACCTCCCAGGCCGATTGCG CCGTAATCATTGTCGCCGCTGGTACCGGTGAATTCGAGGCTGGTA TCTCGAAGAACGGACAGACCCGTGAGCACGCTCTGCTCGCTTTCA CACTCGGTGTCAAGCAGCTGATTGTGGGCGTCAACAAAATGGAGT CCACTGAGCCCCCATACAGCGAATCCCGTTTCGAGGAAATCAAGA AGGAAGTGTCTCCTACATCAAGAAGATCGGTTACAACCCAGCTG CTGTCGCTTTCTGACCCATTTCTGGCTGGCACGGAGTCTCCCTAT AG TGAGTCGTATTAG	132
---------------	---	-----

Приклад 25: Обробка насіння проти гену бета-актина SPODOPTERA LITTORALIS

Насіння кукурудзи обробили молекулами dsRNA, що мають нуклеотидну послідовність, яка по суті ідентична або по суті комплементарна до щонайменше 18 суміжних нуклеотидів гену бета-актину *S. littoralis* (Таблиця 34), відповідно до протоколу, описаного в Прикладі 1. Насіння промивали двічі дистильованою водою (ДДВ) перед обробкою протягом чотирьох годин. Потім насіння сушили при 30 °C протягом ночі. Після етапу сушіння використовували dsRNA, розбавлену 0,1 мМ ЕДТА, в кінцевій концентрації 76 мкг/мл. Обробку виконували шляхом обережного збовтування насіння в розчині протягом 26 годин в темній камері росту при 15 °C. Після обробки насіння пророщували на вологому папері протягом семи діб і потім висадили в 10 грунт і вирощували приблизно при 25 °C зі світло періодом 16 годин. Рослини в міру необхідності поливали водопровідною водою. Насіння, які обробили схожим розчином, що не містить dsRNA, проростили і вирощували поруч з обробленими рослинами в якості контрольних (ЕДТА-контроль).

Через 43 доби після обробки насіння листя оброблених і контрольних рослин використовували в якості єдиного джерела живлення для *S. littoralis*. Рослина № 1 служила в якості джерела живлення для 20 личинок, поміщених в коробку 130x170 мм. Рослина № 2 20 служила в якості джерела живлення для 15 личинок, поміщених в коробку 124 x 95 мм. Рослина № 3 служила в якості джерела живлення для 8 личинок, поміщених в чашку Петрі. Поверхня всіх коробок і планшетів була покрита вермикулітом, і нове листя додавали в міру необхідності. Смертність і масу тіла гусениць відстежували протягом усього експерименту. Через вісім діб після початку експерименту з годування три личинки з 43 були знайдені мертвими як у групі обробки проти бета-актину, так і в контрольній групі. На Фіг. 14 показана середня маса живих 25 личинок *S. littoralis* через вісім діб після початку годування.

Таблиця 34

dsRNA, отримана з гену бета-актину *S. littoralis*

Назва послідовності	Послідовність	SEQ ID No.:
dsRNA №1 бета-актину	CTAATACGACTCACTATAGGGAGAATGGCTCCGGCATGTGCAAGGCC GGTTTCGCCGGCGACGACGCGCCCCGCGCCGTCTTCCCATCCATCGT AGGTCGCCCTCGTCACCAGGGTGTGATGGTTGGTATGGGTGAGAAGG ACTCCTACGTAGGCGATGAGGCCAGAGCAAGAGAGGTATCCTCACC CTGAAGTACCCCATCGAGCACGGTATCATCAACCACTGGGACGACAT GGAGAAGATCTGGCACCACACCTTCTACAACGAGCTGCGCGTCGCC CTGAGGAACACCCAGTCTCCTGACTGAGGCTCCCTCAACCCTAAG GCCAACAGGGAGAAGATGACCCAGATCATGTTTGAGACCTTCAACTC CCCCGCCATGTACGTCGCCATCCAGGCTGTGCTCTCTGTACGCT CTGGTCGTACCACCGGTATCGTCTGGACTCCGGTGATGGTGTCTCC CACACCGTTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTAG	133

Приклад 26: Обробка насіння проти гену NADPH SPODOPTERA LITTORALIS

Насіння кукурудзи обробили молекулами dsRNA (SEQ ID No. 26), які мали нуклеотидну

послідовність, яка по суті ідентична або по суті комплементарна до щонайменше 18 суміжних нуклеотидів гену NADPH *S. littoralis*, відповідно до протоколу, описаного в Прикладі 1. Коротко, насіння промивали двічі дистильованою водою (ДДВ) перед обробкою протягом чотирьох годин. Потім насіння сушили при 30 °C протягом ночі. Після етапу сушіння використовували dsRNA, розбавлену 0,1 мМ ЕДТА, в кінцевій концентрації 154 мкг/мл. Обробку виконували шляхом обережного збовтування насіння в розчині протягом 26 годин в темній камері росту при 15 °C. Після обробки насіння пророщували на вологому папері протягом семи діб і потім висадили в 5 грунт і вирощували приблизно при 25 °C зі світло періодом 16 годин. Рослини в міру необхідності поливали водопровідною водою. Насіння, які обробили схожим розчином, що не містить dsRNA, проростили і вирощували поруч з обробленими рослинами в якості контрольних (ЕДТА-контроль).

Через 43 доби після обробки насіння листя оброблених і контрольних рослин використовували в якості єдиного джерела живлення для *S. littoralis*. Рослина № 1 слугила в якості джерела живлення для 20 личинок, поміщених в коробку 130x170 мм. Рослина № 2 слугила в якості джерела живлення для 15 личинок, поміщених в коробку 124x95 мм. Рослина № 3 слугила в якості джерела живлення для 8 личинок, поміщених в чашку Петрі. Поверхня всіх коробок і планшетів була покрита вермикулітом, і нове листя додавали в міру необхідності. Смертність і масу тіла личинок відстежували протягом усього експерименту. Через вісім діб після початку експерименту з годування три личинки з 43 були знайдені мертвими як у групі обробки проти NADPH, так і в контрольній групі. На Фіг. 15A показана середня маса живих личинок *S. littoralis* через вісім діб після початку годування.

Через 91 добу після обробки насіння листя рослини № 2 використовували вдруге в якості єдиного джерела живлення для *S. littoralis*. Всього 15 личинок в трьох чашках Петрі, що містять по п'ять личинок кожна, харчувалися рослиною, обробленою проти NADPH. Ще 15 личинок в трьох чашках Петрі, що містять по п'ять личинок кожна, харчувалися контрольною рослиною. На Фіг. 15B показаний відсоток мертвих личинок через сім діб після початку експерименту. У групі обробки проти NADPH 9 з 15 личинок були мертві, а в контрольній групі 2 з 15 личинок були мертві.

Приклад 27: Обробка насіння проти генів IAP, АТФази I NADPH SPODOPTERA LITTORALIS

Насіння кукурудзи обробили відповідно до протоколу, описаному в Прикладі 1, молекулами dsRNA (SEQ ID No. 34), що мають нуклеотидну послідовність, яка по суті ідентична або по суті комплементарна до щонайменше 18 суміжних нуклеотидів гена IAP *S. littoralis*, або розчином, який містить суміш dsRNA (SEQ ID No 34, 25, 26 і 31), що мають нуклеотидну послідовність, яка по суті ідентична або по суті комплементарна до щонайменше 18 суміжних нуклеотидів генів IAP, NADPH і АТФази *S. littoralis*. Ці два розчини спочатку використовували для обробки насіння, описаної в Прикладі 7, і потім використовували в даному експерименті. Насіння промивали двічі дистильованою водою (ДДВ) перед обробкою протягом чотирьох годин. Потім насіння сушили при 30 °C протягом ночі. Обробку виконували шляхом обережного збовтування насіння в розчині протягом 24 годин в темній камері росту при 15 °C. Після обробки насіння сушили протягом ночі при 30 °C, висадили в грунт і вирощували приблизно при 25 °C зі світло періодом 16 годин. Рослини в міру необхідності поливали водопровідною водою. Насіння, які обробили схожим розчином (ЕДТА), що не містить dsRNA, проростили і вирощували поруч з обробленими рослинами в якості контрольних.

Через 27 діб після обробки насіння листя оброблених і контрольних рослин використовували в якості єдиного джерела живлення для *S. littoralis*. Всього 24 личинок в трьох чашках Петрі, що містять по вісім личинок кожна, використовували для кожної обробки. Один повтор для обробки проти IAP містив дев'ять личинок. При кожному повторі для годування використовували одну рослину, а через три доби експерименту в чашку додавали другу рослину з тієї ж обробки. Смертність і масу тіла гусениць відстежували протягом усього експерименту. На Фіг. 16A-B показана середня маса живих личинок *S. littoralis* через шість діб після початку експерименту з годування.

Приклад 28: Обробка насіння проти гену EF1α SPODOPTERA LITTORALIS

Насіння кукурудзи обробили відповідно до протоколу, описаному в Прикладі 1, двома молекулами dsRNA, що мають нуклеотидну послідовність, яка по суті ідентична або по суті комплементарна до щонайменше 18 суміжних нуклеотидів гену EF1α *S. littoralis* (Таблиця 33). Коротко, насіння промивали двічі дистильованою водою (ДДВ) перед обробкою протягом чотирьох годин. Потім насіння сушили при 30 °C протягом ночі. Дві послідовності dsRNA (SEQ ID No. 131 і SEQ ID No. 132) використовували роздільно в двох різних обробках насіння; кожна в кінцевій концентрації 67 мкг/мл dsRNA, розведеної 0,1 мМ ЕДТА. Обробку виконували шляхом обережного збовтування насіння в розчині протягом 24 годин в темній камері росту при 15 °C.

5

10

15

25

Таблиця 35

Контрольні dsRNA, отримані з гену DWF кукурудзи

Назва послідовності	Послідовність	SEQ ID No.:
dsRNA №1 DWF1	CTAATACGACTCACTATAGGGAGTGTCAACATGGGTCAGATAACCAGAGCTACCTGCCCAATGAACCTTGCCCTTGCGGTCGTCGCCGAGCTCGACGACCTCACTGTTGGTGGGCTGATCAACGGTTACGGCATCGAGGGGAGCTCTCACCTCTATGGCCTTTTTCTCCGACACGGTTGTCGCGATGGAGGTTGTCTCGCAGATGGCCGGGTGCTCAGAGCCACCAAGGACAACGAGTACTCTGACCTTTTTCTATGGAATTCCTGGTCCCAGGGAACACTGGGGTTCCTTGTCTCTGCAGAGATCAAGCTGATCCCCATCAAGGAGTACATGAAGCTCACCTACACTCCAGTCAAGGGGGGTCTAAAGGAGATCGCGCAGGCCTACGCGGATTCTTTGCTCCGAGGGACGGTGACCCGGCAAAGGTCCCTGACTTTGTTGAAGGGATGGTGTACACAGAGAGCGAGGGGTGTCATGATGACGGCGGTGTACGCTTCGAAAGAAGAGGGCGAAGAAGAAGGGCAACAAGATCAACTGCGTGGGGTGGTGGTTTAAGCCCTGTTTCTACCTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTAG	134
dsRNA №2 DWF1	CTAATACGACTCACTATAGGGAGAGCGAGTTTGTGGAGTACATCCCGACGAGGGAGTACTACCACCGGCACACCCGGTGCCCTGTA CTGGGAGGGGAAGCTGATCCTGCCCTTCGGCGACCAAGTTCGGTTTCAGGTTTCTGCTGGGCTGGCTGATGCCACCGAAGGTGTCCCTGCTGAAGGCGACCCAGGGCGAGGCTATCAGGAAGTACTACCACGACAACCATGTGATCCAGGACATGCTGGTGCCGCTGTACAAGGTTGGGGATGCGCTGGAGTTCGTGCACCGCGAGATGGAGGTGTATCCTCTGTGGCTGTGCCCTCACC GGCTGTACAA GCTGCCGGTGAAGACGATGGTGTACCCGGAGCCTGGGTTTCGAGCACCAGCACAGGCAGGGCGACGCGAGCTACGCACAGATGTTACGGACGTGGCGTGCTACTACGCCCCCGGGCGGTGCTGAGGGGGAGGAGTTCAA CGGCGCGGAGGCTGTGCACAGGCTGGAGCAGTGGCTGATCGAGAACCACAGCTACCAGCCGCAGTACGCGGTGTGCGGAGCTGAACGAGAAGGACTCCTGTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTAG	135

Через 71 добу після обробки насіння листя оброблених проти EF1α №2 і контрольних DWF1

№2 рослин використовували в якості єдиного джерела живлення для *S. littoralis*. Десять рослин з групи обробки були включені в експеримент з годування, з яких дві рослини були перевірені вдруге (див. Фіг. 17A) і вісім рослин були перевірені в перший раз. Листя кожної рослини помістили в три чашки Петрі, що містять по п'ять личинок кожна, в сумі 15 личинок на одну рослину і 150 личинок в сукупності. Дві рослини з контрольної групи, які раніше не перевіряли, були включені в експеримент з годування. Листя кожної контрольної рослини помістили в три чашки Петрі, що містять по п'ять личинок кожна, в сумі 15 личинок на одну рослину і 30 личинок в сукупності. Через вісім діб експерименту неочікувано велика кількість личинок була знайдена мертвими в групі обробки і в контрольній групі. Тому далі аналіз не проводили.

Приклад 29: Обробка насіння проти гену АТФази SPODOPTERA LITTORALIS

Насіння кукурудзи обробили молекулами dsRNA (SEQ ID No. 31), що мають нуклеотидну послідовність, яка по суті ідентична або по суті комплементарна до щонайменше 18 суміжних нуклеотидів гену АТФази *S. littoralis*, відповідно до протоколу, описаного в Прикладі 1. Коротко, насіння промивали двічі дистильованою водою (ДДВ) перед обробкою протягом чотирьох годин. Потім насіння сушили при 30 °C протягом ночі. Після етапу сушіння використовували dsRNA, розбавлену 0,1 mM ЕДТА, в кінцевій концентрації 145 мкг/мл. Розчин DsRNA, містив суміш необроблених молекул dsRNA і оброблених фенолом молекул dsRNA, як вказано в Прикладі 1. Обробку виконували шляхом обережного збовтування насіння в розчині протягом 24 годин в темній камері росту при 15 °C. Після обробки насіння сушили при 30 °C протягом ночі і потім висадили в ґрунт і вирощували приблизно при 25 °C зі світло періодом 16 годин. Рослини в міру необхідності поливали водопровідною водою. Насіння, які обробили dsRNA (SEQ ID No. 20) в концентрації 67 мкг/мл, отриманої з послідовності GUS, проростили і вирощували поруч з обробленими рослинами в якості контрольних.

Через 56 діб після обробки насіння листя оброблених і контрольних рослин використовували в якості єдиного джерела живлення для *S. littoralis*. Десять рослин від обробки були включені в експеримент з годування. Листя кожної рослини помістили в три чашки Петрі, що містять по п'ять личинок кожна, крім рослин № 3 і 14, які були поміщені разом з однієї й ті ж чашки. Всього перевірили 15 личинок на одну рослину і 135 личинок в сукупності. Дві рослини з контрольної групи були включені в експеримент з годування. Листя кожного контрольного рослини помістили в три чашки Петрі, що містять по п'ять личинок кожна, в сумі 15 личинок на одну рослину і 30 личинок в сукупності. Через дванадцять діб годування 12 з 135 личинок були знайдені мертвими в групі обробки проти АТФази, і 21 з 30 личинок були знайдені мертвими в контрольній групі. На Фіг. 18A показаний відсоток мертвих личинок через 12 діб після початку експерименту.

Через 57 діб після обробки насіння інші рослини з тих же обробленої та контрольної груп використовували в якості єдиного джерела живлення для *S. littoralis*. Чотирнадцять рослин з групи обробки були включені в експеримент з годування. Листя кожної рослини помістили в три чашки Петрі, що містять по п'ять личинок кожна, крім рослин № 13 і 4, які були поміщені разом в одні чашки, і рослин № 10 і 19, які були поміщені разом в одні чашки (рослини 4 і 10 аналізували вдруге, див. Фіг. 18A). Були перевірені всього 15 личинок на одну рослину і 180 личинок в сукупності. Дві рослини з контрольної групи були включені в експеримент з годування. Листя кожної контрольної рослини помістили в три чашки Петрі, що містять по п'ять личинок кожна, в сумі 15 личинок на одну рослину і 30 личинок в сукупності. Через чотири доби після початку годування 29 личинок з 180 були знайдені мертвими в групі обробки проти АТФази, і 29 личинок з 30 були знайдені мертвими в контрольній групі. На Фіг. 18B показаний відсоток мертвих личинок через чотири доби після початку експерименту.

Приклад 30: Обробка насіння проти гену EF1α SPODOPTERA LITTORALIS

Насіння кукурудзи (вар. Vivani) обробили молекулами dsRNA (SEQ ID No 131 і 132), що мають нуклеотидну послідовність, яка по суті ідентична або по суті комплементарна до щонайменше 18 суміжних нуклеотидів гену EF1α *S. littoralis*, відповідно до протоколу, описаного в Прикладі 1. Використовували суміш 25 мкг/мл кожної з двох dsRNA. DsRNA розбавили тільки 0,1 mM ЕДТА, або додатково змішали з 40 мкг/мл ПЕГ-модифікованих вуглецевих нанотрубок (ПМВН). Обробку виконували шляхом обережного збовтування насіння в розчині протягом 4 годин в темній камері росту при 15 °C. Після обробки насіння висадили в ґрунт і вирощували приблизно при 25 °C зі світло періодом 16 годин. Рослини в міру необхідності поливали водопровідною водою. Насіння, яке обробили 50 мкг/мл dsRNA, отриманої з послідовності ЗФБ (SEQ ID No. 124), або схожим розчином, що не містить dsRNA, з або без 40 мкг/мл ПЕГ-модифікованих вуглецевих нанотрубок, проростили і вирощували поруч з обробленими рослинами в якості контрольних.

Через 24 доби після обробки насіння листя оброблених і контрольних рослин

використовували в якості єдиного джерела живлення для *S. littoralis*. Десять рослин з групи обробки проти EF1 α , дві рослини з групи ЗФБ-контролю, одна рослина з групи ЕДТА-контролю і одну рослину з групи ЕДТА/ПМБН-контролю були включені в експеримент з годування. Листя кожної рослини помістили в три чашки Петрі, що містять по п'ять личинок кожна, в сумі 15 личинок на одну рослину, 150 личинок для обробки проти EF1 α , 30 личинок для ЗФБ-контролю і 15 для обох груп ЕДТА-контролю. На Фіг. 19А показана середня маса личинок *S. littoralis* після десяти діб годування.

Через 25 діб після обробки насіння листя оброблених і контрольних рослин використовували в якості єдиного джерела живлення для *S. littoralis*. Тринадцять рослин з групи обробки проти EF1 α /ПМБН, дві рослини з ЗФБ/ПМБН-контролю, одна рослина з ЕДТА/ПМБН-контролю і одна рослина з ЕДТА-контролю були включені в експеримент з годування. Листя кожної рослини помістили в три чашки Петрі, що містять по п'ять личинок кожна, в сумі 15 личинок на одну рослину, за винятком рослини 9 в групі EF1 α /ПМБН, де аналізували тільки дві чашки. Перевірили всього 190 личинок для обробки проти EF1 α /ПМБН, 30 личинок для ЗФБ/ПМБН-контролю і 15 личинок для обох груп ЕДТА-контролю. Через сім діб експерименту з годування рослина 1 з групи EF1 α /ПМБН була замінена рослиною 6 з тієї ж групи. На Фіг. 19В показана середня маса личинок *S. littoralis* після десяти діб годування. Для того, щоб визначити рівні експресії EF1 α в личинках після десяти діб годування обробленими рослинами, кожен повтор (чашку) з п'ятьма личинками з'єднали, і екстрагували повну РНК. кДНК приготували, використовуючи оліго-дТ праймери (SEQ ID No 136-143), і рівень експресії мРНК EF1 α *S. littoralis* визначили в оброблених і контрольних личинках за допомогою ПЛР в реальному часі з барвником SYBR Green (компанія Quanta BioSciences), використовуючи актин і АТФазу в якості нормалізаторів. Ніякої істотної зміни в рівнях експресії EF1 α (критерій Уїлкоксона, p -значення > 0,05) не спостерігалось.

Через 61 добу після обробки насіння листя оброблених і контрольних рослин знову використовували в якості єдиного джерела живлення для *S. littoralis*. Тринадцять рослин з групи обробки проти EF1 α /ПМБН і три рослини з ЗФБ/ПМБН-контролю були включені в експеримент з годування. Деякі рослини з групи EF1 α /ПМБН були перевірені в перший раз і деякі були перевірені вдруге (див. Фіг. 19В). Три рослини з ЗФБ/ПМБН-контролю були перевірені в перший раз. Листя кожної рослини помістили в три чашки Петрі, що містять по п'ять личинок кожна, в сумі 15 личинок на одну рослину, за винятком рослини 8 в групі EF1 α /ПМБН, де аналізували тільки дві чашки. Всього перевірили 190 личинок для групи EF1 α /ПМБН і 45 личинок для ЗФБ/ПМБН-контролю. Через дванадцять діб експерименту несподівано велика кількість личинок була знайдена мертвими в групі обробки і контрольній групі. Тому з цього моменту аналіз більше не проводили.

Приклад 31: Обробка насіння проти гену EF1 α SPODOPTERA LITTORALIS

Насіння кукурудзи (вар. 01DKD2) обробили молекулами dsRNA (SEQ ID No 131 і 132), що мають нуклеотидну послідовність, яка по суті ідентична або по суті комплементарна до щонайменше 18 суміжних нуклеотидів гену EF1 α *S. littoralis*, відповідно до протоколу, описаного в Прикладі 1. Використовували суміш з 25 мкг/мл кожної з двох dsRNA. DsRNA або розбавили тільки 0,1 мМ ЕДТА, або додатково змішали з 40 мкг/мл ПЕГ-модифікованих вуглецевих нанотрубок (ПМБН). Обробку виконували шляхом обережного збовтування насіння в розчині протягом 4 годин в темній камері росту при 15 °C. Після обробки насіння висадили в ґрунт і вирощували приблизно при 25 °C зі світло періодом 16 годин. Рослини в міру необхідності поливали водопровідною водою. Насіння, яке обробили 50 мкг/мл dsRNA (SEQ ID No. 20), отриманої з послідовності GUS, з/без 40 мкг/мл ПЕГ-модифікованих вуглецевих нанотрубок, проростили і вирощували поруч з обробленими рослинами в якості контрольних.

Через вісім діб після обробки насіння листя оброблених і контрольних рослин використовували в якості єдиного джерела живлення для *S. littoralis*. Тринадцять рослин від обробки проти EF1 α , тринадцять рослин від обробки проти EF1 α /ПМБН, десять рослин з GUS-контрольних і чотири рослини з GUS/ПМБН контрольних були включені в експеримент з годування. Листя кожної рослини помістили в дві чашки Петрі, покриті 1 % агаром. Кожна чашка містила три личинки, у сумі шести личинок на одну рослину, 78 личинок для обох обробок EF1 α і EF1 α /ПМБН, 60 личинок для ЗФБ-контролю і 24 для GUS/ПМБН-контролю. Масу тіла личинок реєстрували через чотири доби після початку годування. На Фіг. 20А-В показана середня маса личинок *S. littoralis* в контрольній та обробленій групах.

Приклад 32: Обробка насіння проти генів IAP, АТФази I NADPH SPODOPTERA LITTORALIS

Рослини томату, вирощені з насіння томату, описані у Прикладі 7, які обробили молекулами dsRNA (SEQ ID No 34, 35, 25 і 26), що мають нуклеотидну послідовність, яка по суті ідентична або по суті комплементарна до щонайменше 18 суміжних нуклеотидів гену IAP, гену АТФази

або гену NADPH *S. littoralis* далі досліджували для контролю *S. littoralis*.

Через 48 діб після обробки насіння листя оброблених і контрольних рослин використовували в якості єдиного джерела живлення для *S. littoralis*. Одна рослина від кожної обробки служила в якості джерела живлення для семи личинок, поміщених в чашку Петрі. Поверхня всіх планшетів була покрита вермикулітом. Смертність і масу тіла личинок відстежували протягом усього експерименту. Через три доби експерименту одна личинка була знайдена мертвою в групі обробки проти IAP, і дві личинки були знайдені мертвими в групі змішаної обробки. Протягом наступної доби до дня 7 подальших смертей не було. На Фіг. 21 показана середня маса живих личинок *S. littoralis* після трьох і семи діб годування.

Приклад 33: Обробка насіння проти генів бета-актину, АТФази і NADPH *SPODOPTERA LITTORALIS*

Насіння томату обробили молекулами dsRNA (SEQ ID No 133, 31, 25 і 26), що мають нуклеотидну послідовність, яка по суті ідентична або по суті комплементарна до щонайменше 18 суміжних нуклеотидів гену бета-актину *S. littoralis* (див. Таблиця 34), гену АТФази або гену NADPH, відповідно до протоколу, описаного в Прикладі 1. Використовували dsRNA, розбавлену 0,1 мМ ЕДТА, в кінцевій концентрації 96 мкг/мл для бета-актину, 73 мкг/мл для АТФази і 164 мкг/мл для NADPH. Обробку виконували шляхом обережного збовтування насіння в розчині протягом 26 годин в темній камері росту при 15 °С. Після обробки насіння проростили в ґрунті і вирощували приблизно при 25 °С зі світло періодом 16 годин. Рослини в міру необхідності поливали водопровідною водою. Насіння, яке обробили схожим розчином (ЕДТА), що не містить dsRNA, проростили і вирощували поруч з обробленими рослинами в якості контрольних.

Через 42 доби після обробки насіння листя оброблених і контрольних рослин використовували в якості єдиного джерела живлення для *S. littoralis*. Використовували рослини № 1 і 2 від обробки проти бета-актину і проти АТФази і рослини № 21 і 23 від обробки проти NADPH. Рослини від кожної обробки служили в якості джерела живлення для п'яти личинок, поміщених в чашку Петрі. Поверхня всіх планшетів була покрита вермикулітом. Масу тіла личинок відстежували в процесі всього експерименту. На Фіг. 22 показана середня маса личинок *S. littoralis* після чотирьох діб годування.

Приклад 34: Обробка насіння проти гену АТФази *SPODOPTERA LITTORALIS*

Рослини томата, описані в цьому Прикладі, отримані з насіння, оброблених dsRNA проти АТФази як у Прикладі 33, вище.

Через 85 діб після обробки насіння листя оброблених і контрольних рослин, описаних у Прикладі 33, знову використовували як єдине джерело живлення для *S. littoralis*. Використовували одну рослину від обробки проти АТФази і одну рослину з контрольних. Листя від цих рослин помістили в три чашки Петрі, по п'яти личинок в кожну. Через три доби експерименту ще одну рослину з оброблених і ще одну рослину з контрольних додали у відповідні чашки. Масу тіла личинок відстежували в ході всього експерименту. Оскільки на початку експерименту з годування личинки з контрольної групи були на 30 % меншими ніж личинки, що харчувалися обробленими рослинами, реєстрували масу личинок щодо їх початкової маси. На Фіг. 23А показана відносна маса личинок *S. littoralis* після шести діб годування.

Через 88 діб після обробки насіння інші рослини від тієї ж обробки насіння використовували в якості єдиного джерела живлення для *S. littoralis*. Використовували три рослини від обробки проти АТФази і дві рослини з контрольних. Листя від цих рослин помістили в три чашки Петрі, по п'ять личинок в кожну. Смертність і масу тіла личинок відстежували протягом усього експерименту. Після годування протягом п'яти діб 4 з 15 і 1 з 15 личинок були знайдені мертвими в групі АТФази і контрольній групі, відповідно. На Фіг. 23В показана середня маса живих личинок *S. littoralis* після п'яти діб годування.

Приклад 35: Обробка насіння проти гену NADPH *SPODOPTERA LITTORALIS*

Рослини томату, описані в цьому Прикладі, отримані з насіння, оброблених dsRNA NADPH з Прикладу 33, вище.

Через 95 діб після обробки насіння листя оброблених і контрольних рослин використовували в якості єдиного джерела живлення для *S. littoralis*. Використовували дві рослини від обробки проти NADPH (раніше не перевірялись) і набір рослин з контрольних. Листя від цих рослин помістили в три чашки Петрі, по п'ять личинок в кожну. Масу тіла гусениць відстежували в процесі всього експерименту. На Фіг. 24А показана середня маса личинок *S. littoralis* після чотирьох діб годування. На четвертий день контрольні рослини були замінені рослинами, які були пророщені з насіння, обробленого проти гена AFR8 томату. Це насіння обробили сумішшю двох dsRNA-послідовностей (SEQ ID No. 25 і 26) в кінцевій концентрації 200 мкг/мл (100 мкг/мл кожної dsRNA) протягом 24 годин. На шостий день додали ще одну рослину

до кожної з двох рослин, оброблених проти NADPH. На Фіг. 24B показана середня маса личинок *S. littoralis* через сім діб після початку експерименту з годування.

Приклад 36: Обробка насіння проти генів, що не належать до *SPODOPTERA LITTORALIS*

Рослини кукурудзи, описані в цьому Прикладі, отримані з насіння, оброблених як у Прикладі 28 (dsRNA №2 DWF1, SEQ ID NO: 135) і в Прикладі 29 (GUS, SEQ ID NO: 20).

Через 69 діб після обробки насіння листя пророслих рослин використовували в якості єдиного джерела живлення для *S. littoralis*. Дві рослини від обробки DsRNA №2 DWF1 і п'ять рослин від обробки GUS були включені в експеримент з годування. Листя кожної рослини помістили в три чашки Петрі, що містять по п'ять личинок кожна, в сумі 15 личинок на одну рослину, 30 личинок для обробки DsRNA №2 DWF1 і 75 личинок для обробки GUS. Через десять діб експерименту несподівано велика кількість личинок були знайдені мертвими в обох обробках. Через велику кількість смертей в обох групах обробки в цей момент часу експеримент був припинений.

Через 70 діб після обробки насіння інші рослини від тих же обробок використовували в якості єдиного джерела живлення для *S. littoralis*. Дві рослини від обробки DsRNA №2 DWF1 і 16 рослин від обробки GUS були включені в експеримент з годування. Листя кожної рослини помістили в три чашки Петрі, що містять по п'ять личинок кожна, в сумі 15 личинок на одну рослину, 30 личинок для обробки DWF1 dsRNA №2 і 240 личинок для обробки GUS. Через дев'ять діб експерименту несподівано велика кількість личинок були знайдені мертвими в обох обробках. Через велику кількість смертей в обох групах обробки в цей момент часу експеримент був припинений.

Приклад 37: Обробка насіння проти генів АТФази, EF1α і NADPH *SPODOPTERA LITTORALIS*

Насіння кукурудзи (вар. Vivani) обробили молекулами dsRNA (SEQ ID No: 131, 132, 31, 25 і 26), що мають нуклеотидну послідовність, яка по суті ідентична або по суті комплементарна до щонайменше 18 суміжних нуклеотидів гену EF1α, гену АТФази або гену NADPH *S. littoralis*, відповідно до протоколу, описаного в Прикладі 1, без промивання перед обробкою. Дві dsRNA EF1α використовували роздільно. Використовували dsRNA, розбавлену 0,1 мМ ЕДТА, в кінцевій концентрації 160 мкг/мл. Обробку виконували шляхом обережного збовтування насіння в розчині протягом 2 годин в темній камері росту при 15 °C. Після обробки насіння швидко промили ДДВ, висадили в ґрунт і вирощували приблизно при 25 °C зі світло періодом 16 годин. Рослини в міру необхідності поливали водопровідною водою. Насіння, яке обробили 160 мкг/мл dsRNA (SEQ ID No.: 124), отриманої з 3ФБ-послідовності, або схожим розчином, що не містить dsRNA (ЕДТА) проростили і вирощували поруч з обробленими рослинами в якості контрольних.

Через 31 добу після обробки насіння листя пророслих рослин використовували в якості єдиного джерела живлення для *S. littoralis*. Личинки, взяті для цього експерименту, мали вік до п'яти годин (тобто до п'яти годин після виведення). Шість рослин від кожної обробки були включені в експеримент з годування. Листя кожної рослини помістили в 16 лунок 24-лункового планшета, що містять одну личинку в кожній лунці, в сумі 16 личинок на одну рослину і 96 личинок на одну обробку. Поверхню лунок покрили 1 %-й агарозою. Через вісім діб після початку годування 57 личинок були знайдені мертвими в групі обробки проти АТФази, і 42 личинки були знайдені мертвими в групі обробки проти NADPH. Кількість мертвих личинок в інших групах становила від 13 до 23. Середня кількість мертвих личинок на шести рослинах, оброблених проти АТФази, була значно більша ніж середня кількість мертвих личинок на шести рослинах 3ФБ-контролю при р-значенні 0,03 (t-критерій). Подібно до цього, середня кількість мертвих личинок на рослинах, оброблених проти NADPH, була більшою ніж середня кількість мертвих личинок на рослинах 3ФБ-контролю (t-критерій, р-значення = 0,07). На Фіг. 25A і B показаний відсоток мертвих личинок через вісім діб після початку годування. На Фіг. 25C і D показаний відсоток мертвих личинок через десять діб після початку годування. На Фіг. 25E показана середня маса живих личинок *S. littoralis* через 11 діб після початку експерименту з годування.

Через 32 доби після обробки насіння інші рослини від тієї ж обробки насіння використовували в якості єдиного джерела живлення для *S. littoralis*. Личинки, взяті для цього експерименту, мали вік до 24 годин. Від п'яти до семи рослин від кожної обробки були включені в експеримент з годування. Листя кожної рослини помістили в 16 лунок 24-лункового планшета, що містять по одній личинці кожна, в сумі 16 личинок на одну рослину, 80 личинок для ЕДТА, 96 личинок для 3ФБ і АТФази і 112 личинок для NADPH і для двох обробок проти EF1α. Поверхню лунок була покрита 1 %-й агарозою. Масу тіла личинок реєстрували через вісім і дев'ять діб після початку годування; деяких личинок, що харчувалися підгрупою рослин, реєстрували на восьмий день та інших личинок реєстрували на дев'ятий день. На Фіг. 25F показана середня

маса живих личинок *S. littoralis* на одну рослину.

Приклад 38: Обробка насіння, направлена на шкідників ряду COLEOPTERA

Цей Приклад ілюструє варіанти здійснення, які не обмежують способу отримання рослини, що має підвищену стійкість до шкідника ряду Coleoptera, що включає етап вирощування рослини з насінини, яка контактувала з екзогенною нетранскрибованою dsRNA, причому вказана рослина має поліпшену стійкість до вказаного шкідника в порівнянні з рослиною, вирощеної з насінини, що не контактувала з вказаною dsRNA. Більш конкретно, цей Приклад ілюструє спосіб отримання рослини кукурудзи, що має підвищену стійкість до кукурудзяного кореневого жука (*Diabrotica* sp.), включаючи етап вирощування рослини кукурудзи з насінини кукурудзи, яке контактувало щонайменше з одною dsRNA, розробленої для сайленсінгу гена-мішені, ендогенного для кукурудзяного кореневого жука, причому ця рослина кукурудзи, яка виросла з насінини кукурудзи має поліпшену стійкість до кукурудзяного кореневого жука в порівнянні з рослиною кукурудзи, що виросла з насінини кукурудзи, яка не контактувала з dsRNA.

Тригер dsRNA з 228 пар основ з послідовністю смислового ланцюга GGCTGATAGCACTTAAGGAGCTTCCTAATCACGAAAGAATTCTGCAGGATT TAGTTATGGACATACTGAGAGTACTCTCTGCTCCTGACTTAGAAGTCCGCAA GAAGACTTTAAGTCTAGCCCTTGAATTAGTCTCTTCACGGAACATAGAAGA AATGGTATTAGTATTAACAAAGGAAGTGAGTAAACGGTAGACAGTGAACATGAGGATACAGGAA AGTACAGGC (MON104454, SEQ ID No.: 144) був перевірений шляхом аналізу інвазії кукурудзяного кореневого жука в рослини кукурудзи, вирощені з насіння, яке контактувало перед проростанням з тригером dsRNA. Насіння кукурудзи (70 насінин, сорт LH244) помістили в 50-мл пробірку типу Falcon з 35 мл розчину тригера dsRNA в буфері (0,1 mM ЕДТА, розведеного від концентрації 0,5 M з pH 8) або 35 мл тільки буфера в якості нульового контролю і інкубували в темноті при 15° C при слабкому перемішуванні протягом 8 годин. Насіння трансгенної рослини кукурудзи, яке експресує конструкт супресії PHK, націлений на DvSnf7 і яке має стійкість до кукурудзяного кореневого жука, використовували в трансгенному позитивному контролі і також інкубували перед проростанням в 35 мл тільки буфера. DvSnf7 - це ортолог Snf7 з *Diabrotica virgifera virgifera* (західний кукурудзяний жук, ЗКЖ), який є компонентом комплексу ESCRT-III (ендосомний сортуючий комплекс, необхідний для транспорту), див. Bolognesi et al. (2012) PLoS ONE 7 (10): e47534, doi: 10.1371/journal.pone.0047534. Наступного дня насіння тричі промили (кожна промивка по 1 хвилині при слабкому перемішуванні) в достатній кількості води для того, щоб наповнити пробірку типу Falcon. Промите насіння посіяли на глибину 1,25 см в 15-см поліетиленові горщики з закритим дном, наповнені ґрунтом Metromix 200. У всіх обробках проросло більше 85 % насіння. На стадії V2/V3 (приблизно через 2 тижні після посіву) 50 новонароджених личинок *Diabrotica virgifera virgifera* додали в кожен горщик (виконали 12-15 реплік). В якості трансгенного позитивного контролю використовували рослини кукурудзи, що експресують рекомбінантний трансген Snf7 і також використовували личинки *Diabrotica virgifera virgifera*. Через приблизно 4 тижні личинки ізолювали, використовуючи воронку Берлезе, підраховували і зважили. Вирахували виживаність і масу личинок. Результати представлені на Фіг. 26. Виживаність личинок на одну рослину істотно не відрізнялась між личинками, що харчувалися рослинами кукурудзи, вирощеними з насіння, обробленого тригером dsRNA в концентрації 50 частин на мільйон (мкг/мл), і личинок, що харчувалися контрольними рослинами (Фіг. 26A), але сукупна маса личинок (Фіг. 26B) і середня маса личинок (Фіг. 26C) були значно нижче у личинок, що харчувалися рослинами кукурудзи, вирощеними з насіння, обробленого тригером dsRNA в концентрації 50 частин на мільйон (мкг/мл), в порівнянні з личинками, що харчувалися контрольними рослинами. Рослини, вирощені з насіння, обробленого тригером dsRNA в концентрації 500 частин на мільйон, показали уповільнений ріст рослин і коренів, що могло вплинути на результати, що спостерігалися; тим не менш, виживаність личинок на одну рослину була значно нижчою (Фіг. 26A), і сукупна маса личинок (Фіг. 26B) і середня маса личинок (Фіг. 26C) були значно меншими у личинок, що харчувалися рослинами кукурудзи, вирощеними з насіння, обробленого тригером dsRNA в концентрації 500 частин на мільйон (мкг/мл), у порівнянні з личинками, що харчувалися контрольними рослинами. Аналізи за допомогою QuantiGene не детектували значної кількості PHK MON104454 в тканині листя або коріні рослин кукурудзи, вирощених з насіння, обробленого тригером dsRNA в концентрації 500 частин на мільйон.

Схожий експеримент провели на рослинах томата, вирощених з насіння, обробленого перед проростанням шляхом інкубації протягом ночі в тригері dsRNA з 279 пар основ з тупими кінцями в концентрації 100 частин на мільйон (мкг/мл) з послідовністю смислового ланцюга TACCTGTGGCTCTCACAGGCAGCGAAGATGGTACCGTTAGAGTTTGGCATACGAATACACACAG

ATTAGAGAATTGTTTGAATTATGGGTTTCGAGAGAGTGTGGACCATTTGTTGCTTGAAGGGTTCGA
ATAATGTTTCTCTGGGGTATGACGAGGGCAGTATATTAGTGAAGTTGGAAGAGAAGAACCGGCA
GTTAGTATGGATGCCAGTGGCGGTAAAATAATTTGGGCAAGGCACTCGGATTACAACAAGCTAAT
TTGAAGGCGCTGCCAGAAGG (T6593, SEQ ID No.: 145) і виконали аналіз на інвазію *Leptinotarsa*
5 *decemlineata* (колорадський картопляний жук, КЖ). Контрольні рослини обробили або буфером
("композиція") або тригером dsRNA для зеленого флуоресцентного білка (ЗФБ). Коефіцієнт
проростання склав > 90 %, і не спостерігалось жодних очевидних впливів на зростання
оброблених рослин в порівнянні з контрольними рослинами. Не спостерігалось ніякого істотного
10 впливу на коефіцієнт дефоліації рослин томата (Фіг. 27А), або на життєздатність личинок (Фіг.
27В), або на середню масу личинок (Фіг. 27С) рослин, оброблених або dsRNA T6593 або dsRNA
ЗФБ, у порівнянні з контрольними рослинами. Аналізи QuantiGene не детектували будь-яку
значущу кількість РНК T6593 в проаналізованих тканинах (молодий лист, старий лист,
сім'ядоля, корінь) рослин томата, вирощених з насіння, обробленого тригером dsRNA T6593 в
концентрації 500 частин на мільйон.

15 Приклад 39: Обробка насіння, направлена на суттєві гени шкідників ряду COLEOPTERA

Цей Приклад ілюструє варіанти здійснення, які не обмежують способу отримання рослини,
що має підвищену стійкість до шкідника ряду Coleoptera, що включає етап вирощування
рослини з насіння, яка контактувала з екзогенною нетранскрибованою dsRNA, причому
вказана рослина має поліпшену стійкість до вказаного шкідника в порівнянні з рослиною,
20 вирощеної з насіння, що не контактувала з вказаною dsRNA. Більш конкретно, цей Приклад
ілюструє спосіб отримання рослини кукурудзи, що має підвищену стійкість до кукурудзяного
кореневого жука (*Diabrotica* sp.), включаючи етап вирощування рослини кукурудзи з насіння
кукурудзи, яка контактувала щонайменше з одним полінуклеотидним тригером, розробленим
для сайленсінгу гена-мішені, ендегенного для кукурудзяного кореневого жука, причому рослина
25 кукурудзи, пророщена з цієї насіння кукурудзи, має поліпшену стійкість до кукурудзяного
кореневого жука в порівнянні з рослиною кукурудзи, вирощеною з насіння кукурудзи, що не
контактувала з цим полінуклеотидним тригером.

Отримано тригери дволанцюгової РНК (dsRNA) для генів-мішеней, зазначених в Таблиці 36.
Відповідні тригери мають довжину 21-1000 пар основ; в деяких варіантах здійснення 21-50, 50-
30 100, 100-200, 200-500, 500-700 або 700-1000 пар основ. Тригери, представлені в Таблиці 36,
мають довжину 173-504 пар основ, але для способів, розкритих в даному документі підходять
більш коротші або більш довші тригери. Встановлено, що всі тригери dsRNA, представлені в
Таблиці 36, викликали істотне уповільнення росту і смертність личинок при концентрації 10
частин на мільйон і 0,1 частини на мільйон в біологічному аналізі раціону для *Diabrotica virgifera*
35 *virgifera* (західного кукурудзяного жука, ЗКЖ), як вказано в робочих прикладах в опублікованій
патентній заявці США № 2009/0307803, які включені в даний документ шляхом посилання, і в
яких тригер dsRNA нанесений як покриваючий шар на поверхню твердого раціону для комах в
96-лунковому планшеті.

Таблиця 36

Тригери dsRNA

Ід. № тригера	Довжина тригера (пар основ)	Ген-мішень	SEQ ID NO. ГЕНА- МІШЕНІ
T33514	501	Croquemort	146
T33515	502	Прогноз: подібний ENSANGP00000020392	147
T33516	500	Катепсин-L-подібна протеїназа	148
T33519	501	Неохарактеризований консервативний білок	149
T30147	502	Субодинаця фактора 3 ініціації еукариотичної трансляції, путативна	150
T30502	501	Субодинаця 6 фактора специфічності відщеплення і поліаденілювання	151
T32275	502	Субодинаця 6 фактора специфічності відщеплення і поліаденілювання	152
T32328	504	Субодинаця 6 фактора специфічності відщеплення і поліаденілювання	153
T30501	501	Гомолог Лісенцефалії-1	154

T30145	502	Білок з Wd-повтором	155
T33520	501	Натрій-залежний транспортер фосфату	156
T30139	502	Дельта субодиниці білка 1 Т-комплексу	157
T30137	502	Путативний неохарактеризований білок	158
T32250	502	Родина 2 розчинного носія, полегшений елемент 6 транспортера глюкози	159
T30133	501	Не АТФазна регуляторна субодиниця 26S протеасоми, путативна	160
T30471	501	Білок 75, що містить WD повтор	161
T30132	501	Білок, подібний субодиниці 5 ТНО-комплексу	162
T30469	502	Ще один білок транскрипційної одиниці	163
T30467	502	CG8315	164
T30466	374	Путативний неохарактеризований білок	165
T33522	500	Убіквітин-білок лігаз (E3) UBR2	166
T30463	502	Член В родини доменів TMEM9	167
T30462	501	Субодиниця 1 фактора 2 ініціації еукариотичної трансляції	168
T32319	500	Субодиниця 1 фактора 2 ініціації еукариотичної трансляції	169
T30126	502	Фактор 6 пре-мРНК-процесингу	170
T32320	496	Дегідратаза дельта-амінолевулінової кислоти	171
T30456	502	Білок 7 переносу ліпідів, споріднений домену StAR	172
T32316	496	Не АТФазна регуляторна субодиниця 26S протеасоми, путативна	173
T30117	502	Путативний неохарактеризований білок	174
T30112	502	Субодиниця 2 фактора IIF загальної транскрипції	175
T30423	501	Ядерний антиген проліфераційних клітин	176
T32201	502	Ядерний антиген проліфераційних клітин	177
T30420	501	Кактин	178
T30417	501	Білок SEC22b везикулярного транспорту	179
T30106	482	Путативний неохарактеризований білок	180
T33528	501	Apop-15Ab	181
T30411	502	АТФ-залежна РНК-геліказа SUV3, мітохондріальна	182
T33531	501	Транспортер АТФ--зв'язуючих касет	183
T30371	490	Білок Nup107 нуклеопорінового комплексу	184

** (+) значне уповільнення росту або смертність в порівнянні з обробленим водою контролем; (-) відсутність значного уповільнення росту або смертності у порівнянні з обробленим водою контролем; NT = (1) тригер не перевіряли, або (2) відбулися наступні 2 події: проба не показала значного уповільнення росту/смертності, і позитивний контроль не показав значного уповільнення росту/смертності в даному тесті. Позитивним контролем в даному аналізі була dsRNA з послідовністю, раніше розкритою як SEQ ID NO.: 880 в патенті США № 7,943,819.

Тригери тупокінцевих дволанцюгових РНК (dsRNA) для кожної з послідовностей тригерів з Таблиці 36 синтезували і перевірили шляхом аналізу інвазії кукурудзяного кореневого жука в рослини кукурудзи, вирощені з насіння кукурудзи, перед проростанням за допомогою окремого тригера dsRNA, як вказано вище в Прикладі 38, використовуючи личинок *Diabrotica virgifera virgifera*, причому аналізували смертність чи уповільнення росту личинок внаслідок контакту з полінуклеотидними тригерами або їх поїдання. Тригери, які за отриманими даними були ефективними для уповільнення росту або смертності личинок перевіряли далі.

Передбачається, що способи, в яких використовується комбінація визначених полінуклеотидних тригерів відповідно до поданих варіантів здійснення (наприклад, тригерів dsRNA, описаних у даному документі) з одним або декількома неполінуклеотидними пестицидами, забезпечать синергетичне поліпшення в запобіганні або боротьбі з інвазією комах в порівнянні з ефектом, що отримується за допомогою тільки полінуклеотидних тригерів або тільки неполінуклеотидного пестициду. В одному варіанті здійснення рослини кукурудзи, які мають підвищену стійкість до інвазії кукурудзяного кореневого жука, вирощені з насіння, що мають у їх геномі послідовність рекомбінантної ДНК, яка кодує неполінуклеотидний пестицид, причому перед пророщуванням насіння вводять в контакт з ефективною кількістю полінуклеотидного тригера. Біологічні аналізи, такі як аналіз інвазії кукурудзяного кореневого

жука, описані в даному документі, підходять для визначення дози-ефекту для смертності або інгібування росту личинок при використанні комбінацій з полінуклеотидних тригерів з представлених варіантів здійснення і одного або декількох неполінуклеотидних пестицидів (наприклад, пататин, рослинний лектин, фітоекдистероїд, інсектицидний білок *Bacillus thuringiensis*, інсектицидний білок *Xenorhabdus*, інсектицидний білок *Photorhabdus*, інсектицидний білок *Bacillus laterosporous* і інсектицидний білок *Bacillus sphearicus*). Фахівець у даній галузі техніки може перевірити комбінації з полінуклеотидних тригерів і неполінуклеотидних пестицидів звичайними біологічними аналізами для того, щоб ідентифікувати комбінації біологічно активних речовин, які можуть бути об'єднані і є бажаними для захисту рослин від інвазії комах.

Приклад 40: Обробка насіння полінуклеотидами dsRNA, націленими на вірус золоті крапчастості томату (ToGMoV)

Наступний Приклад ілюструє спосіб отримання рослини з поліпшеною стійкістю до вірусного патогену, включаючи етап вирощування рослини з насінини, просякнутої екзогенним нетранскрибованим полінуклеотидом dsRNA, що включає послідовність, яка по суті ідентична або по суті комплементарна до щонайменше 18 суміжних нуклеотидів гена вірусного патогена. У цьому експерименті для кожної обробки використовували 40 насінин.

Полінуклеотидні тригери dsRNA, що включають послідовність, гомологічну до 5'- або 3'- послідовності гена AC1 (білок, пов'язаний з репліказою) вірусу золоті крапчастості томату (ToGMoV), які вказані в Таблиці 37, розбавили до 100 мкг/мл в 0,1 мМ ЕДТА pH 8.0, до кінцевого об'єму 0,6 мл. По 40 насінин томату (*Solanum lycopersicum*, вар. HP375) для кожного полінуклеотидного тригера dsRNA помістили в 2-мл пробірки Еппендорф для інкубації в розчині полінуклеотида dsRNA. Додатково 40 насінин томату інкубували в розчині, що містить полінуклеотид dsRNA, націлений на генну послідовність β -глюкуронідази *E.coli* (GUS), в якості негативного контролю. Інкубацію виконували в темряві при 15 °C зі слабким перемішуванням протягом 24 годин.

Таблиця 37

Послідовності ToGMoV, використані в експериментах з обробки насіння

SEQ ID NO	Ген-мішень	Вид
185	ToGMoV AC1/Rep1 (5")	Вірус золоті крапчастості томата
186	ToGMoV AC1/Rep1 (3")	Вірус золоті крапчастості томата

Наступного дня насіння тричі промили (кожна промивка по 1 хв при слабкому перемішуванні) у кількості води, достатній для наповнення пробірки Еппендорф. Промите насіння висадили на глибину 1,25 см в 15-см поліетиленові горщики, заповнені ґрунтом Metromix 200, і інкубували в стандартних умовах зростання в камері: 25 °C вдень, 22 °C вночі; 12-годинний день; інтенсивність освітлення ~ 15000 люкс. Приблизно через 2 тижні після посадки сім'ядол, які з'явилися, інокулювали ToGMoV за допомогою сільськогосподарської інокуляції.

Сільськогосподарське інфікування рослин томату було виконано так, як по суті описано у Grimsley N, Hohn T, Davies JW, Hohn B (1987) "Agrobacterium-mediated delivery of infectious Maize streak virus into maize plants". *Nature* 325: 177-179. Коротко, агроінфекційні клони компонентів ДНК-А і ДНК-В ToGMoV були вирощені в живильному середовищі Luria-Broth, доповненого селективним антибіотиком спектиноміцином (стійкість до якого була надана двійковим вектором). Культури виростили до OD600=0,4-0,5 при 28 °C в інкубаторі зі збовтуванням. Агроінфікування виконали двічі на кожній рослині. Агроінфіковані рослини утримували в умовах камери росту і контролювали на ознаки вірусної інфекції разом з неінфікованими рослинами, вирощуваних у тій же камері росту.

Через 14 діб після інокуляції вірусу листя рослин, приблизно 226 мм², що еквівалентно двом стандартним пучкам, зібрали і підготували для аналізу QuantiGene. Як можна бачити на Фіг. 28A, рослини, оброблені тригерами dsRNA 5'AC1 (SEQ ID NO. 185) вірусу золоті крапчастості томату (ToGMoV), накопили вірус (що виміряли за рівнями РНК гену AC1) на рівні, який незначно відрізняється від контрольної групи. Навпаки, рослини, оброблені тригерами dsRNA 3'AC1 (SEQ ID NO. 186) вірусу золоті крапчастості томату, показали статично значиме зниження в рівнях накопичення вірусу ToGMoV в порівнянні з контрольною групою, обробленою GUS, істотному при альфа 0,05. Див. Фіг. 28B.

Приклад 41: Обробка насіння полінуклеотидами DSRNA, направлених на вірус мозаїки огірка (CMV)

Наступний Приклад ілюструє спосіб отримання рослини з поліпшеною стійкістю до вірусного патогену, включаючи етап вирощування рослини з насінини, просякнутої екзогенним нетранскрибованим полінуклеотидом dsRNA, що включає послідовність, яка по суті ідентична або по суті комплементарна до щонайменше 18 суміжних нуклеотидів гена вірусу мозаїки огірка (CMV). У цьому експерименті для кожної обробки використовували по 40 насінин.

Полінуклеотидні тригери dsRNA, що включають послідовність, гомологічну до 5'- або 3'- послідовності гена 3b-нуклеокапсида (NC) CMV, які вказані в Таблиці 38, розбавили до 100 мкг/мл в 0,1 мМ ЕДТА рН 8,0, до кінцевого об'єму 0,6 мл. Для кожного полінуклеотидного тригера dsRNA 40 насінин томату (*Solanum lycopersicum*, вар. HP375) помістили в 2-мл пробірки Еппендорф і інкубували в розчині полінуклеотида dsRNA. Ще 40 насінин томату інкубували в присутності полінуклеотида dsRNA, націленого на послідовність гена β -глюкуронідази *E.coli* (GUS) в якості негативного контролю. Інкубацію виконали в темряві при 15 °C зі слабким перемішуванням протягом 24 годин.

Таблиця 38

Послідовності CMV, використані в експериментах з обробки насіння

SEQ ID NO	Ген-мішень	Вид
187	3b-нуклеокапсид (NC)	Вірус мозаїки огірка
188	3b-нуклеокапсид (NC)	Вірус мозаїки огірка

Наступного дня насіння тричі промили (кожна промивка по 1 хв при слабкому перемішуванні) у кількості води, достатній для наповнення пробірки Еппендорф. Промите насіння висадили на глибину 1,25 см в 15-см поліетиленові горщики, заповнені ґрунтом Metromix 200, і інкубували в стандартних умовах росту в камері: 28 °C вдень, 21 °C вночі; 16-годинний денний цикл. Приблизно через 2 тижні після посадки сім'ядолі, які з'явилися, інокулювали CMV за допомогою інфікування втиранням з використанням стандартного протоколу, відомого з літератури (Roger Hull: Mechanical Inoculation of Plant Viruses; Current Protocols in Microbiology, +2005, 13: 16B6.1-16B6.4). Коротко, 1 г симптоматичної тканини листя відомого CMV-інфікованої рослини подрібноли у стерильній ступці товчачиком в 25 мл 0,1М крижаного фосфатного буфера (рН 7,8). Цей інокуляційний буфер м'яко втирали в сім'ядолі рослин, обсипаних порошком карборунда. Після інокуляції рослини залишили в тепличних умовах і контролювали на ознаки інфекції.

Через 14 діб після інокуляції вірусу листя рослин, приблизно 226 мм², що еквівалентно двом стандартним пучкам, зібрали і підготували для аналізу QuantiGene. Як можна спостерігати на Фіг. 29А, рослини, оброблені полінуклеотидним тригером dsRNA (SEQ ID NO. 187) 5 '3b проти вірусу мозаїки огірка (CMV), накопичували вірус (що виміряли за рівнями РНК гена 3b-NC) до рівня, який незначно відрізнявся від контрольної групи, хоча і зі слабким трендом, що знижувався. Подібний результат спостерігався у рослин, оброблених полінуклеотидним тригером dsRNA (SEQ ID NO. 188) 5 '3b проти вірусу мозаїки огірка (CMV). Див. Фіг. 29В.

Приклад 42: Обробка насіння полінуклеотидами dsRNA, направлених на вірус плямистого в'янення томата (TSWV)

Наступний Приклад ілюструє спосіб отримання рослини з поліпшеною стійкістю до вірусного патогену, включаючи етап вирощування рослини з насінини, просякнутої екзогенним нетранскрибованим полінуклеотидом dsRNA, що включає послідовність, яка по суті ідентична або по суті комплементарна до щонайменше 18 суміжних нуклеотидів гена вірусу плямистого в'янення томату (TSWV).

Полінуклеотидний тригер dsRNA, що включає послідовність, гомологічну 3'-послідовності гена нуклеокапсида (N) TSWV (SEQ ID NO. 190), розбавили до 100 мкг/мл в 0,1 мМ ЕДТА рН 8.0 до кінцевого об'єму 0,6мл. Сорок насінин томату (*Solanum lycopersicum*, вар. HP375) помістили в 2-мл пробірку Еппендорфа і інкубували в розчині полінуклеотида dsRNA. Ще 40 насінин томата інкубували в присутності полінуклеотида dsRNA, направлено на послідовність гена β -глюкуронідази (GUS) *E. coli* в якості негативного контролю. Інкубацію виконали в темряві при 15 °C зі слабким перемішуванням протягом 24 годин. Наступного дня насіння тричі промили (кожна промивка по 1 хв зі слабким перемішуванням) у кількості води, достатній для наповнення пробірки Еппендорфа. Промите насіння висадили на глибину 1,25см в 15-см поліетиленові горщики, заповнені ґрунтом Metromix 200, і інкубували в стандартних умовах росту в камері: 28 °C вдень, 21 °C вночі; 16-годинний денний цикл.

Приблизно через 2 тижні після посадки сім'ядолі, які з'явилися, інокулювали TSWV за

допомогою інфікування втиранням з використанням стандартного протоколу, відомого з літератури (Roger Hull: Mechanical Inoculation of Plant Viruses; Current Protocols in Microbiology, 2005, 13: 16B6.1-16B6.4). Коротко, 1 г симптоматичної тканини листя відомої TSWV-інфікованої рослини подрібнили у стерильній ступці товкачиком в 25 мл 0,1М крижаного фосфатного буфера (pH 7,8). Цей інокуляційний буфер м'яко втирали в сім'ядолі рослин, обсипаних порошком карборунда. Після інокуляції рослини залишили в тепличних умовах і контролювали на ознаки інфекції.

Через 14 діб після інокуляції вірусу листя рослин, приблизно 226 мм², що еквівалентно двом стандартним пучкам, зібрали і підготували для аналізу QuantiGene. Як можна спостерігати на Фіг. 30, рослини, оброблені полінуклеотидним тригером dsRNA (SEQ ID NO. 190) 3'N проти вірусу плямистого в'янення томата (TSWV), накопичували вірус (що виміряли за рівнями РНК гена 3b-NC) до рівня, який незначно відрізняється від контрольної групи.

Приклад 43: Обробка насіння полінуклеотидами dsRNA, направленими на вірус плямистого в'янення томата (TSWV)

Наступний Приклад ілюструє спосіб отримання рослини з поліпшеною стійкістю до вірусного патогену, включаючи етап вирощування рослини з насінини, просякнutoї екзогенним нетранскрибованим полінуклеотидом dsRNA, що включає послідовність, яка по суті ідентична або по суті комплементарна до щонайменше 18 суміжних нуклеотидів гена вірусу плямистого в'янення томату (TSWV).

Полінуклеотидний тригер dsRNA, що включає послідовність, гомологічну 5'-послідовності гена нуклеокапсида (N) TSWV (SEQ ID NO. 189), розбавили до 100 мкг/мл в 0,1 мМ ЕДТА pH 8.0 до кінцевого об'єму 0,6 мл. Сорок насінин томату (*Solanum lycopersicum*, вар. HP375) помістили в 2-мл пробірку Еппендорфа, яка містить розчин полінуклеотида dsRNA. Ще 40 насінин томату інкубували в присутності полінуклеотида dsRNA, направлено на послідовність гена β -глюкоронідази *E. coli* (GUS, SEQ ID No. 20) в якості негативного контролю. Інкубацію виконали в темряві при 15 °C зі слабким перемішуванням протягом 24 годин. Наступного дня насіння тричі промили (кожна промивка по 1 хв зі слабким перемішуванням) у кількості води, достатній для наповнення пробірки Еппендорфа. Промите насіння висадили на глибину 1,25 см в 15-см поліетиленові горщики, наповнені ґрунтом Metromix 200, і інкубували в стандартних умовах росту в камері: 28 °C вдень, 21 °C вночі; 16-годинний денний цикл.

Приблизно через 2 тижні після посадки сім'ядолі, які з'явилися, інокулювали TSWV за допомогою інфікування втиранням з використанням стандартного протоколу, відомого з літератури (Roger Hull: Mechanical Inoculation of Plant Viruses; Current Protocols in Microbiology, 2005, 13: 16B6.1-16B6.4). Коротко, 1 г симптоматичної тканини листя відомої TSWV-інфікованої рослини подрібнили у стерильній ступці товкачиком в 25 мл 0,1М крижаного фосфатного буфера (pH 7,8). Цей інокуляційний буфер м'яко втирали в сім'ядолі рослин, обсипаних порошком карборунда. Після інокуляції рослини залишили в тепличних умовах і контролювали на ознаки інфекції.

Через 14 діб після інокуляції вірусу листя рослин, приблизно 226 мм², що еквівалентно двом стандартним пучкам, зібрали і підготували для аналізу QuantiGene. Рослини, оброблені полінуклеотидом dsRNA (SEQ ID NO. 189) 5'N TSWV накопичували вірус (що виміряли за рівнями РНК гена 3b-NC) до рівня нижче, ніж у контрольній групі.

Приклад 44: Створення молекул dsRNA для сайленсінгу гена EF1 α *S. LITTORALIS*

Полінуклеотидні тригери dsRNA, отримані з гена EF1 α *S. littoralis*, проаналізували проти генома кукурудзи (*Zea mays-taxid: 4577*, Фіг. 31), використовуючи програму BLAST з параметрами, описаними в Прикладі 7. Вибрали молекули dsRNA, направлені на ген EF1 α *S. littoralis* і які мають гомологію з геном кукурудзи.

Приклад 45: Експресія EF1 α кукурудзи, яка змінилась, після обробки насіння dsRNA *S. LITTORALIS*

Насіння кукурудзи (вар. Vivani) обробили відповідно до протоколу, описаному в Прикладі 1 молекулами екзогенної нетранскрибованої dsRNA (SEQ ID No 131 і 132), отриманими з послідовності гена EF1 α *S. littoralis* без промивки як до, так і після обробки. Використовували суміш з 25 мкг/мл кожної dsRNA. DsRNA або розбавляли 0,1 мМ ЕДТА, або змішували з 40мкг/мл ПЕГ-модифікованих вуглецевих нанотрубок. Обробку виконували шляхом обережного збовтування насіння в розчині протягом 4 годин в темній камері росту при 15 °C. Після обробки насіння висадили в ґрунт і вирощували приблизно при 25 °C зі світло періодом 16 годин. Рослини в міру необхідності поливали водопровідною водою. Насіння, оброблене 50 мкг/мл dsRNA, отриманої з ЗФБ-послідовності, проростили і вирощували поруч з рослинами, обробленими dsRNA EF1 α , в якості контрольних.

Повну РНК екстрагували з листя пророслого насіння через 20 діб після обробки. кДНК

підготували, використовуючи оліго-dT праймери, і рівень експресії мРНК EF1α кукурудзи визначили в оброблених і контрольних рослинах шляхом ПЛР в реальному часі з барвником SYBR Green (компанія Quanta BioSciences). Гени домашнього господарства GPM120 і NFE101 використовували в якості ендегенних контрольних генів для того, щоб нормалізувати кількості, що вводяться. Праймери були розраховані так, щоб не ампліфікувати тригер dsRNA і, таким чином, детектувати тільки отриману з кукурудзи мРНК EF1α.

Таблиця 39

Праймери, використані для 3Т-ПЛР-аналізу на рівень експресії EF1α

Ген-мішень	Прямий/ Зворотний	Послідовність праймера	SEQ ID No.
EF1α	Прямий	GCAACCACTCCCAAAATACTC	191
EF1α	Зворотний	CAGGGTTGTACCCAACTTTTC	192
GPM120	Прямий	AGGCTTTTCGCTGCGTGTT	193
GPM120	Зворотний	TGGCCCATCCAAACTCAGA	194
NFE101	Прямий	GCTCAAGTTCTTCGGATGAC	195
NFE101	Зворотний	ACTTCTTCCAGCAGACTAGC	196

Цей аналіз показав істотне підвищення експресії (критерій Уїлкоксона, р-значення <0,05) мРНК EF1α кукурудзи. Медіанний рівень експресії EF1α в рослинах, оброблених dsRNA *S. littoralis*, був у 2,12 і 1,68 рази вище ніж у контрольних рослин, оброблених dsRNA ЗФБ, з ПЕГ-модифікованими вуглецевими нанотрубками або без них, відповідно. Див. Фіг. 32А і В.

Рослини, оброблені dsRNA/ПМВН знову проаналізували на рівень експресії EF1α через 48 діб після обробки. Цей аналіз показав підвищення експресії мРНК EF1α кукурудзи. Медіанний рівень експресії EF1α в рослинах, оброблених dsRNA *S. littoralis*, був у 1,66 рази вище ніж у контрольних рослин, оброблених dsRNA ЗФБ. Див. Фіг. 32С.

Приклад 46: Експресія бета-актину, АТФази і NADPH EF1α після обробки насіння молекул dsRNA *S. LITTORALIS*

Насіння кукурудзи обробили молекулами тригера екзогенної нетранскрибованої dsRNA, отриманими з генів *S. littoralis* відповідно до протоколу, описаного в Прикладі 1. Насіння промивали двічі дистильованою водою (ДДВ) перед обробкою протягом чотирьох годин. Потім насіння сушили при 30 °C протягом ночі. Після етапу сушіння використовували кінцеву концентрацію 132 мкг/мл dsRNA для EF1α (суміш dsRNA №1 (SEQ ID No. 131) та dsRNA №2 (SEQ ID No. 132) у приблизно рівних концентраціях), 53 мкг/мл dsRNA для АТФази (SEQ ID No. 31), 76 мкг/мл dsRNA для бета-актину (SEQ ID No. 133) і 154 мкг/мл dsRNA для NADPH (SEQ ID No. 25 і 26), все розбавлені 0,1 мМ ЕДТА. Обробку виконували шляхом обережного збовтування насіння в розчині протягом 26 годин в темній камері росту при 15 °C. Після обробки насіння швидко промоли ДДВ і помістили на вологий папір для проростання, не застосовуючи етап сушіння. Через сім діб після проростання паростки висадили в ґрунт і вирощували приблизно при 25 °C зі світло періодом 16 годин. Рослини в міру необхідності поливали водопровідною водою. Насіння, яке обробили схожим розчином (ЕДТА), що містить dsRNA, проростили і вирощували поруч з обробленими рослинами в якості контрольних.

Через дев'ять тижнів після обробки повну РНК екстрагували з листя пророслого насіння. кДНК приготували, використовуючи оліго-dT і випадкові праймери, і рівень експресії бета-актину, АТФази і NADPH EF1α кукурудзи визначили в оброблених і контрольних рослинах. Кількість проаналізованих рослин становила 3, 4, 3, 3 і 7 для бета-актину, АТФази, NADPH EF1α і контролю, відповідно. Ген домашнього господарства FKBP (FK506-зв'язуючий білок, далі FKBP) використовували в якості ендегенного контрольного гена, щоб нормалізувати введені кількості. Праймери були розроблені так, щоб не ампліфікувати тригери dsRNA і, таким чином, детектувати тільки мРНК, отримані з кукурудзи.

Таблиця 40

Праймери, використані для ЗТ-ПЛР-аналізу на рівень експресії БЕТА-АКТИНУ, АТФази і NADPH EF1α.

Ген-мішень	Прямий/ Зворотний	Послідовність праймера	SEQ ID No.
EF1α	Прямий	GCAACCACTCCCAATACTC	197
EF1α	Зворотний	CAGGGTTGTACCCAACCTTC	198
Бета-актин	Прямий	TCTGGCATCACACCTTCTAC	199
Бета-актин	Зворотний	TTCTCACGGTTAGCCTTTGG	200
АТФаза	Прямий 1	TGTCCTGCCATCTCTATCTC	201
АТФаза	Зворотний 1	ACATCCGAATGGTCTCTACG	202
АТФаза	Прямий 2	CACAACCGTGCAGTTTACAG	203
АТФаза	Зворотний 2	AAATGCGCCCAAGCATATCG	204
NADPH	Прямий	CAGAGGACGAGGAATATGAG	205
NADPH	Зворотний	CTAGCAGCATTGTCTAGTAGG	206
FKBP	Прямий	CGGTGTTTCGACAGCAGCTAC	207
FKBP	Зворотний	CTTCGCCGCCAACAATACCC	208

Через невеликий розмір групи цей аналіз не показав значних відмінностей в експресії цих генів (критерій Уїлкоксона, р-значення > 0,05), але експресія EF1α показала тенденцію до підвищення. Медіанний рівень експресії EF1α в рослинах, оброблених dsRNA EF1α *S. littoralis* був в 2,28 рази вище ніж у контрольних рослинах (Фіг. 33).

Приклад 47: Експресія EF1α і АТФази кукурудзи після обробки насіння молекулами dsRNA *S. LITTORALIS*

Насіння кукурудзи обробили молекулами тригера екзогенної нетранскрибованої dsRNA з генів EF1α і АТФази *S. littoralis* відповідно до протоколу, описаному в Прикладі 1. Насіння промили двічі дистильованою водою (ДДВ) перед обробкою протягом чотирьох годин і сушили при 30 °C протягом ночі. Дві dsRNA-послідовності EF1α (dsRNA №1 (SEQ ID No. 131) та №2 (SEQ ID No. 132)) використовували роздільно для двох різних обробок насіння; кожна в кінцевій концентрації 67 мкг/мл dsRNA. dsRNA АТФази (SEQ ID No. 31) використовували в кінцевій концентрації 145 мкг/мл. Всі dsRNA були розбавлені 0,1 мМ ЕДТА. Обробку виконували шляхом обережного збовтування насіння в розчині протягом 24 годин в темній камері росту при 15 °C. Після обробки насіння сушили при 30 °C протягом ночі і потім висадили в ґрунт і вирощували приблизно при 25 °C зі світлом періодом 16 годин. Рослини в міру необхідності поливали водопровідною водою. Насіння, яке обробили 67 мкг/мл dsRNA (SEQ ID No. 20), отриманої з послідовності GUS, проростили і вирощували поруч з обробленими рослинами в якості контрольних.

Через сім діб після обробки повну РНК екстрагували з листя пророслого насіння, і рівень експресії EF1α і АТФази кукурудзи визначили в оброблених і контрольних рослинах так, як вказано в Прикладі 2, вище. Ген домашнього господарства GPM120 використовували в якості ендогенного контрольного гена, щоб нормалізувати введені кількості. Праймери були розроблені так, щоб не ампліфікувати тригери dsRNA і, таким чином, детектувати тільки мРНК, отриману з кукурудзи.

Таблиця 41

Праймери, використані для ЗТ-ПЛР-аналізу на рівень експресії EF1α і АТФази

Ген-мішень	Прямий/ Зворотний	Послідовність праймера	SEQ ID No.
EF1α	Прямий	GCAACCACTCCCAATACTC	191
EF1α	Зворотний	CAGGGTTGTACCCAACCTTC	192
АТФаза	Прямий	GCGCAAGTTTTTCGTAGATGAC	209
АТФаза	Зворотний	ACCATAGTCCACAGATGACAC	210
GMP120	Прямий	GCTGCGTGTTGTGCGTTCTG	211
GMP120	Зворотний	TCGTGCGTGCTGTCTGTTC	212

Значних відмінностей в експресії цих генів не спостерігалось.

Приклад 48: Експресія NADPH кукурудзи після обробки насіння dsRNA *S. LITTORALIS*

Насіння кукурудзи (вар. 01DKD2) обробили відповідно до протоколу, описаному в Прикладі 45, молекулами тригера екзогенної нетранскрибованої dsRNA (SEQ ID No. 26), отриманими з гена NADPH *S. littoralis*. Використовували кінцеву концентрацію 80 мкг/мл dsRNA, розведеної 0,1 мМ ЕДТА. Обробку виконували шляхом обережного збовтування насіння в розчині протягом 3,5 годин в темній камері росту при 15 °C. Після обробки насіння висадили в ґрунт і вирощували приблизно при 25 °C зі світло періодом 16 годин. Рослини в міру необхідності поливали водопровідною водою. Насіння, яке обробили dsRNA ЗФБ або схожим розчином, що не містить dsRNA, проростили і вирощували поруч з обробленими рослинами в якості контрольних.

Через 20 діб після обробки повну РНК екстрагували з листя пророслого насіння, і рівень експресії NADPH кукурудзи визначили в оброблених і контрольних рослинах так, як вказано в Прикладі 45, вище. Гени домашнього господарства GPM120 і NFE101 використовували в якості ендогенних контрольних генів для того, щоб нормалізувати введені кількості. Праймери були розроблені так, щоб не ампліфікувати тригер dsRNA і, таким чином, детектувати тільки мРНК, отриману з кукурудзи.

Таблиця 42

Праймери, використані для ЗТ-ПЛР-аналізу на рівень експресії NADPH

Ген-мішень	Прямий/ Зворотний	Послідовність праймера	SEQ ID No.
NADPH	Прямий	CAGAGGACGAGGAATATGAG	205
NADPH	Зворотний	CTAGCAGCATTGTCACTAGG	206
GPM120	Прямий	AGGCTTTTCGCTGCGTGTT	213
GMP120	Зворотний	TGGCCCATCCAAACTCAGA	214
NFE101	Прямий	GCTCAAGTTCTTCGGATGAC	215
NFE101	Зворотний	ACTTCTTCCAGCAGACTAGC	216

Значних відмінностей в експресії NADPH не спостерігалось.

Приклад 49: Експресія EF1α кукурудзи після обробки насіння молекулами dsRNA *S. LITTORALIS*

Насіння кукурудзи (вар. 01DKD2) обробили відповідно до протоколу, описаному в Прикладі 45, молекулами тригера екзогенної нетранскрибованої dsRNA (SEQ ID No. 131), отриманої з гена EF1α *S. littoralis*. Використовували суміш з 25 мкг/мл кожної з двох dsRNA. DsRNA розбавили або тільки 0,1 мМ ЕДТА, або додатково змішали з 40 мкг/мл ПЕГ-модифікованих вуглецевих нанотрубок (ПМВН). Обробку виконували шляхом обережного збовтування насіння в розчині протягом 4 годин в темній камері росту при 15 °C. Після обробки насіння висадили в ґрунт і вирощували приблизно при 25 °C зі світло періодом 16 годин. Рослини в міру необхідності поливали водопровідною водою. Насіння, яке обробили 50 мкг/мл dsRNA, отриманої з послідовності GUS, з/без 40 мкг/мл ПЕГ-модифікованих вуглецевих нанотрубок проростили і вирощували поруч з обробленими рослинами в якості контрольних.

Через 20 діб після обробки повну РНК екстрагували з листя пророслого насіння, і рівень експресії EF1α кукурудзи визначили в оброблених і контрольних рослинах так, як вказано в Прикладі 45. Гени домашнього господарства GPM120, NFE101 і експресовані використовували в якості ендогенних контрольних генів для того, щоб нормалізувати введені кількості. Праймери були розроблені так, щоб не ампліфікувати тригер dsRNA і, таким чином, детектувати тільки мРНК, отриману з кукурудзи.

Таблиця 43

Праймери, використані для ЗТ-ПЛР-аналізу на рівень експресії EF1α

Ген-мішень	Прямий/ Зворотний	Послідовність праймера	SEQ ID No.
EF1α	Прямий	GCAACCACTCCCAATACTC	198
EF1α	Зворотний	CAGGGTTGTACCCAACCTTC	199
GPM120	Прямий	AGGCTTTTCGCTGCGTGTT	193
GMP120	Зворотний	TGGCCCATCCAAACTCAGA	194

Продовження таблиці 43

NFE101	Прямий	GCTCAAGTTCTTCGGATGAC	215
Експресований	Прямий	GGATGCTACTCGCCAGACA	217
Експресований	Зворотний	GTGGTCAGCCTGCTTCAAC	218

Значних відмінностей в експресії EF1α не спостерігалось.

Приклад 50: Експресія EF1α кукурудзи після обробки насіння молекулами dsRNA *S. LITTORALIS*

Насіння кукурудзи (вар. Vivani) обробили відповідно до протоколу, описаному в Прикладі 1, молекулами тригера екзогенної нетранскрибованої dsRNA (SEQ ID No 131 і 132), отриманої з гена EF1α *S. littoralis*, без промивання перед обробкою. Використовували суміш 25 мкг/мл кожної з двох dsRNA. DsRNA розбавили або тільки 0,1 мМ ЕДТА, або додатково змішали з 40 мкг/мл ПЕГ-модифікованих вуглецевих нанотрубок (ПМВН). Обробку виконували шляхом обережного збовтування насіння в розчині протягом 4 годин в темній камері росту при 15 °С. Після обробки насіння швидко промили ДДВ і прямо проростили в ґрунті без етапу сушіння. Рослини вирощували приблизно при 25 °С зі світло періодом 16 годин і при необхідності поливали водопровідною водою. Насіння, яке обробили схожим розчином, що не містить dsRNA, або з 50 мкг/мл dsRNA, отриманої з послідовності ЗФБ, з/без 40 мкг/мл ПЕГ-модифікованих вуглецевих нанотрубок проростили і вирощували поруч з обробленими рослинами в якості контрольних.

Через 14 діб після обробки повну РНК екстрагували з листя пророслого насіння, і рівень експресії EF1α кукурудзи визначили в оброблених і контрольних рослинах так, як вказано в Прикладі 45, вище. Ген домашнього господарства NFE101 і експресований використовували в якості ендogenous контрольних генів для того, щоб нормалізувати введені кількості. Праймери були розроблені так, щоб не ампліфікувати тригер dsRNA і, таким чином, детектувати тільки мРНК, отриману з кукурудзи.

Таблиця 44

Праймери, використані для ЗТ-ПЛР-аналізу на рівень експресії EF1α

Ген-мішень	Прямий/ Зворотний	Послідовність праймера	SEQ ID No.
EF1α	Прямий	GCAACCACTCCCAAATACTC	197
EF1α	Зворотний	CAGGGTTGTACCCAACCTTC	198
NFE101	Прямий	GCTCAAGTTCTTCGGATGAC	215
Експресований	Прямий	GGATGCTACTCGCCAGACA	217
Експресований	Зворотний	GTGGTCAGCCTGCTTCAAC	218

Значних відмінностей в експресії EF1α не спостерігалось.

Приклад 51: Експресія EF1α кукурудзи після обробки насіння молекулами dsRNA *S. LITTORALIS*

Насіння кукурудзи (вар. Vivani) обробили відповідно до протоколу, описаному в Прикладі 1, молекулами тригера екзогенної нетранскрибованої dsRNA (SEQ ID No 131 і 132), отриманої з гена EF1α *S. littoralis*, без промивання перед обробкою. Дві dsRNA використовували роздільно, кожна в кінцевій концентрації 160 мкг/мл. DsRNA розбавили тільки буфером компанії IDT (30 мМ HEPES, pH 7.5, 100 мМ ацетату калію) або додатково змішали з 40 мкг/мл ПЕГ-модифікованих вуглецевих нанотрубок (ПМВН). Обробку виконували шляхом обережного збовтування насіння в розчині протягом 7 годин в темній камері росту при 25 °С. Після обробки насіння швидко промили ДДЗ і прямо проростили в ґрунті без етапу сушіння. Рослини вирощували приблизно при 25 °С зі світло періодом 16 годин і при необхідності поливали водопровідною водою. Насіння, яке обробили схожим розчином, що не містить dsRNA, або 160 мкг/мл dsRNA, отриманої з послідовності ЗФБ, з/без 40 мкг/мл ПЕГ-модифікованих вуглецевих нанотрубок проростили і вирощували поруч з обробленими рослинами в якості контрольних.

Через шість діб після обробки повну РНК екстрагували з листя пророслого насіння, і рівень експресії EF1α кукурудзи визначили в оброблених і контрольних рослинах так, як вказано в Прикладі 45, вище. Гени домашнього господарства GPM120 і експресованих використовували в якості ендogenous контрольних генів для того, щоб нормалізувати введені кількості. Праймери

були розроблені так, щоб не ампліфікувати тригер dsRNA і, таким чином, детектувати тільки мРНК, отриману з кукурудзи.

Таблиця 45

Праймери, використані для ЗТ-ПЛР-аналізу на рівень експресії EF1α

Ген-мішень	Прямий/ Зворотний	Послідовність праймера	SEQ ID No.
EF1α	Прямий 1	GCAACCACTCCCAAATACTC	197
EF1α	Зворотний 1	CAGGGTTGTACCCAACCTTC	198
EF1α	Прямий 2	CCCAGGTCATCATCATGAAC	191
EF1α	Зворотний 2	GAGCTCAGCAAACCTTGACAG	192
GPM120	Прямий	GCTGCGTGTGTGCGTTCTG	211
Експресований	Прямий	GGATGCTACTCGCCAGACA	217
Експресований	Зворотний	GTGGTCAGCCTGCTTCAAC	218

- 5 Результати цього аналізу показані на Фіг. 34. Значне підвищення експресії мРНК EF1α кукурудзи спостерігалось в рослинах після обробки dsRNA №1 EF1α (t-критерій, р-значення = 0,004). Середній рівень експресії EF1α в рослинах, оброблених цією dsRNA, був у 1,8 рази вище ніж у контрольних рослинах, оброблених dsRNA GUS. Після об'єднання в групу всіх рослин, оброблених молекулами dsRNA EF1α (dsRNA №1 і №2, з ПМБН і без них), і порівняння з усіма
- 10 рослинами, обробленими dsRNA GUS (з ПМБН і без них) спостерігалось значне підвищення експресії мРНК EF1α кукурудзи. Дивіться Фіг. 34В. Середній рівень експресії EF1α в рослинах, оброблених молекулами dsRNA EF1α, був у 1,73 рази вище ніж у контрольних рослинах, оброблених dsRNA GUS (t-критерій, р-значення = 0,005).

- 15 Приклад 52: Експресія АТФази і NADPH кукурудзи після обробки насіння молекулами dsRNA S. LITTORALIS

- Насіння кукурудзи (вар. Vivani) обробили відповідно до протоколу, описаному в Прикладі 1, молекулами тригера екзогенної нетранскрибованої dsRNA (SEQ ID No 31 і 26), отриманої з генів АТФаза і NADPH S. littoralis, без промивки перед обробкою. Використовували кінцеву концентрацію 160 мкг/мл dsRNA, розведеної 0,1 мМ ЕДТА. Обробку виконували шляхом
- 20 обережного збовтування насіння в розчині протягом 2 годин в темній камері росту при 15 °С. Після обробки насіння швидко промоли ДДВ, висадили в ґрунт і вирощували приблизно при 25 °С зі світло періодом 16 годин. Рослини в міру необхідності поливали водопровідною водою. Насіння, яке обробили 160 мкг/мл dsRNA (SEQ ID No. 124), отриманої з послідовності ЗФБ, або схожим розчином, що не містить dsRNA (ЕДТА), проростили і вирощували поруч з обробленими
- 25 рослинами в якості контрольних.

- Через 27 діб після обробки повну РНК екстрагували з листя пророслого насіння, і рівні експресії АТФази і NADPH кукурудзи визначили в оброблених і контрольних рослинах так, як вказано в Прикладі 45, вище. Ген домашнього господарства, експресований, використовували в якості ендogenousного контрольного гена для того, щоб нормалізувати введені кількості. Праймери
- 30 були розроблені так, щоб не ампліфікувати тригер dsRNA і, таким чином, детектувати тільки мРНК, отриману з кукурудзи.

Таблиця 46

Праймери, використані для ЗТ-ПЛР-аналізу на рівень експресії АТФази і NADPH

Ген-мішень	Прямий/ Зворотний	Послідовність праймера	SEQ ID No.
АТФаза	Прямий	GCGCAAGTTTTTCGTAGATGAC	219
АТФаза	Зворотний	ACCATAGTCCACAGATGACAC	220
NADPH	Прямий	CAGAGGACGAGGAATATGAG	205
NADPH	Зворотний	CTAGCAGCATTTGTCACTAGG	206
Експресований	Прямий	GGATGCTACTCGCCAGACA	217
Експресований	Зворотний	GTGGTCAGCCTGCTTCAAC	218

- 35 Результати цього аналізу показані на Фіг. 35А (експресія АТФази) і 35В і С (експресія NADPH). Ніяких відмінностей у рівнях експресії АТФази кукурудзи після обробки dsRNA АТФази

S. littoralis не детектували. Однак спостерігалася тенденція до зниження експресії мРНК NADPH кукурудзи в рослинах після обробки тригерами dsRNA NADPH. Середній рівень експресії NADPH в рослинах, оброблених цим тригером dsRNA, був у 1,37 рази нижче ніж у контрольних рослинах, оброблених тригером dsRNA ЗФБ (t-критерій, р-значення = 0,11). Після об'єднання в

5 групу всіх контрольних рослин (оброблених dsRNA ЗФБ і оброблених ЕДТА) і порівняння з рослинами, обробленими тригером dsRNA NADPH, спостерігали значне зниження експресії мРНК NADPH кукурудзи при середньому зниженні в 1,67 рази в рівнях експресії NADPH після обробки молекулами dsRNA NADPH (t-критерій, р-значення = 0,02).

Хоча винахід був описаний у зв'язку з конкретними варіантами його здійснення, зрозуміло, що фахівцям у даній галузі техніки будуть очевидними багато альтернатив, модифікацій і

10 варіацій. Відповідно, припускається, що він охоплює всі такі альтернативи, модифікації і варіації, які підпадають під сутність і широкий об'єм прикладеної формули винаходу.

Усі публікації, патенти і патентні заявки, згадані в даному описі винаходу, включені в даний документ в їх повному обсязі шляхом посилання в даному описі в тій же мірі, як якби кожна

15 окрема публікація, патент або патентна заявка була конкретно і окремо вказана як включена в даний документ шляхом посилання. Крім цього, приведення або вказування будь-якого посилання в даній заявці не повинно тлумачитися як допущення того, що таке посилання служить в якості відомого джерела для даного винаходу. Що ж стосується заголовків розділів, то вони не повинні тлумачитися в обмежувальному сенсі.

20

SEQUENCE LISTING

<110> A.B. Seeds Ltd.
 Avniel, Amir
 Lidor-Nili, Efrat
 Maor, Rudy
 Meir, Ofir
 Noivirt-Brik, Orly

<120> METHODS OF INTRODUCING dsRNA TO PLANT SEEDS FOR MODULATING GENE
 EXPRESSION

<130> P34098

<150> 61/748,095
 <151> 2013-01-01

<150> 61/748,101
 <151> 2013-01-01

<150> 61/748,094
 <151> 2013-01-01

<150> 61/748,099
 <151> 2013-01-01

<150> 61/814,888
 <151> 2013-04-23

<150> 61/814,892
 <151> 2013-04-23

<150> 61/814,899
 <151> 2013-04-23

<150> 61/814,890
 <151> 2013-04-23

<150> 61/908,965
 <151> 2013-11-26

<150> 61/908,855
 <151> 2013-11-26

<160> 220

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 1
 taatacgact cactataggg

<210> 2
 <211> 19

<212> DNA
 <213> artificial Sequence

 <220>
 <223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

 <400> 2
 ggtgctctga acgtggatg 19

<210> 3
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> artificial Sequence

 <220>
 <223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

 <400> 3
 catcatcgcc atcctcattc tc 22

<210> 4
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> artificial Sequence

 <220>
 <223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

 <400> 4
 taatacgact cactataggg gaagaccctc gaaactaagc 40

<210> 5
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> artificial Sequence

 <220>
 <223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

 <400> 5
 taatacgact cactataggg ggtaagcggc attctaaacc 40

<210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> artificial Sequence

 <220>
 <223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

 <400> 6
 actcagcagt cgtaggattg 20

<210> 7
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> artificial Sequence

<220>
 <223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 7
 cttcttatgt tcccgtcagg 20

<210> 8
 <211> 616
 <212> RNA
 <213> CGMMV

<400> 8
 uaaauacgacu cacuauaggg gguaagcggc auucuaaacc uccaaaucgg agguuggacu 60
 cugcuucuga agaguccagu ucuguuucuu uugaagaugg cuuacaaucc gaucacaccu 120
 agcaaacuua uugcguuuag ugcuuuuau guucccgua ggacuuuacu uaaauuucua 180
 guugcuucac aagguaccgc uuuccagacu caagcgggaa gagauucuuu ccgcgagucc 240
 cugucugcgu uaccucguc ugucguagau auuaauucua gauucccaga ugcggguuuu 300
 uacgcuuucc ucaacggucc uguguugagg ccuaucucg uuucgcuucu cagcuccacg 360
 gauacgcgua auagggucau ugagguugua gaucuaagca auccuacgac ugcugagucg 420
 cuuaacgccg uaaagcguac ugaugacgcg ucuacggccg cuagggcuga gauagauaa 480
 uuaauagagu cuauuucuaa ggguuuugau guuuacgaa gggcuucauu ugaagccgcg 540
 uuuucgguag ucuggucaga ggcuaaccacc ucgaaagcuu aguuucgagg gucuucccu 600
 auagugaguc guauua 616

<210> 9
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> artificial Sequence

<220>
 <223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 9
 taatacgact cactataggg catcaccatc gaccctaaac 40

<210> 10
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> artificial Sequence

<220>
 <223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 10
 taatacgact cactataggg gctttaccgc cactaagaac 40

<210> 11

<211> 598
<212> RNA
<213> CGMMV

<400> 11
uaauacgacu cacuauaggg gcuuuaccgc cacuaagaac ucuguacacu cccuugcggg 60
uggucugagg cuucuugaau uggaauauau gaugaugcaa gugcccuacg gcucaccuug 120
uuaugacauc ggcgguaacu auacgcagca cuuguucaaa gguagaucan augugcauug 180
cugcaauccg ugccuagauc uuaaagaugu ugcgaggaau gugauguaca acgauaugau 240
cacgcaacau guacagaggc acaagggau uggcgggugc agaccucuuc caacuuucca 300
gauagaugca uucaggaggu acgauaguuc ucccugugcg gucaccuguu cagacguuuu 360
ccaagagugu uccuauugu uugggagugg uagggaauau caugcagucu cguugcauuc 420
aaucuacgau aucccuauu cuucgaucgg accugcucu cauaggaaaa augugcgagu 480
uuguuaugca gccuucauu ucucggaggc auugcuuuu gguucgccug uagguaauuu 540
aaauaguauu ggggcucagu uuagggucca uggugaugcc cuauagugag ucguauua 598

<210> 12
<211> 19
<212> DNA
<213> artificial Sequence

<220>
<223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 12
ggtgctctga acgtggatg 19

<210> 13
<211> 22
<212> DNA
<213> artificial Sequence

<220>
<223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 13
catcatcgcc atcctcattc tc 22

<210> 14
<211> 43
<212> DNA
<213> artificial Sequence

<220>
<223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 14
taatacgact cactataggg agcattcccg gcgggatagt ctg 43

<210> 15
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> artificial Sequence

 <220>
 <223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

 <400> 15
 taatacgact cactataggg agcattcccg gcgggatagt ctg 43

 <210> 16
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> artificial Sequence

 <220>
 <223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

 <400> 16
 cagcgcggaag tctttatacc 20

 <210> 17
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> artificial Sequence

 <220>
 <223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

 <400> 17
 ctttgccgta atgagtgacc 20

 <210> 18
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> artificial Sequence

 <220>
 <223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

 <400> 18
 ccataaccct ggaggttgag 20

 <210> 19
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> artificial Sequence

 <220>
 <223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

 <400> 19
 atcagacgct gctggtctgg 20

 <210> 20
 <211> 443

<212> RNA
<213> *Escherichia coli*

<400> 20
 uauuacgacu cacuauaggg agaucgacgg ccugugggca uucagucugg aucgcgaaaa 60
 cuguggaauu gaucagcguu ggugggaaag cgcguaacaa gaaagccggg cuauugcugu 120
 gccaggcagu uuuuacgauc aguucgccga ugcagauauu cguauuauug cgggcaacgu 180
 cugguauacag cgcaagucu uuauaccgaa agguugggca ggccagcgua ucgugcugcg 240
 uuucgaugcg gucacucau acggcaaagu gugggucaau aaucaggaag ugauggagca 300
 ucagggcggc uauacgccau uugaagccga ugucacgccg uauguuauug ccgggaaaag 360
 uguacguauc accguuugug ugaacaacga acugaacugg cagacuaucc cgccgggaau 420
 gcucccuaua gugagucgua uua 443

<210> 21
<211> 2070
<212> DNA
<213> *Spodoptera littoralis*

<400> 21
 atgtcagaca gcgcacagga cgttctacag gatgcggtag ccggcgccgc cgctgctgct 60
 gccgatgccg ctgatggatc gctgttttagc acctttgata taattgttct cgttatctta 120
 ttgggaggca ccatctggtg gctatacaac tccaaaaagg aaaacaaaaa agatgaaatt 180
 ctgctgagca aatattccat ccaggctgcg ggatccattc aagtactga aaattctttt 240
 ataaacaaac taaagtcac tggagaagt ttagttgtat tctatgggtc tcaaacgggt 300
 actggtgagg agttcgcggg acgtcttgcc aaggagggca tacgatacaa gatgaagggt 360
 atggttgctg atcccgaaga atgtgatgtg gaagaactta tgaaactcca agaaataccg 420
 aattcattag ctgtgttctg tatggcaaca tatggtgaag gagatccac agacaactct 480
 atggagtttt atgaatggat aaagaacgga gaaccggacc taactggttt aaattatgcc 540
 gtgtttggcc ttggcaacaa gacatatgaa cattacaatg cggttgctat atatctagat 600
 aaacgtcttg aagaacttgg cgctacaaga gtctttgaac ttgggcttgg agatgatgac 660
 gctaattattg aagatgactt tatcacctgg aaagaaaagt tctggccagc tgtatgtgag 720
 aaattcaata ttgagagcac tggatgaaga gagttgattc gtcagttccg tcttggtact 780
 cacggacctg atgacataca acctaacaa atatttactg gagaaattgc cagattacac 840
 tccttacaag tccagaggcc accttatgat gccaagaatc cattccttgc tcaaatcaca 900
 gttaatagag aattacataa ggttgagat aggtcttgta tccatgtcga attggatatt 960
 tcagactcca aaatgcgata tgaagcaggat gatcatgtgg ctgtgtaccc aataaatgac 1020
 tctaaccttg tagatcgtct aggacaatta acaggggcca accttgacga gatcttctct 1080

ctcatcaaca ctgaccagga aagcagcaaa aagcatcctt tcccttgccc aacctcctat	1140
cgcactgcat tatcacacta tgttgagatt actgcattgc cccgtactca catattaaga	1200
gagttggttg aatactgtac agatgaagaa gacaaaaaga aattgatgct catggcaact	1260
aattctcaag agggcaaggc catgtaccaa tcatttattg tagaggcttg cagaaatatt	1320
gtgcacatct tggaagatgt accatcttgt aaacctccac tggaccactt gtgtgaactt	1380
ttacctcgcc tacaaccaag atactactcc atctcatcca gtcctaagat gtatccagag	1440
acagtgcata ttactgcagt cgttggtcaa tataaaacac ctacgggtcg cgtcaacaaa	1500
ggtgttacga caacatggtt agcagataac aaaccgaac ccggcaagcc tcttcctctg	1560
gtacccgat tttatcagaaa atcacaattc cgattacccc tgcaaagtca aacccccata	1620
ataatggctg gtcttggtac aggattagct cctttccgtg gattcttgca agagcgtgct	1680
ttcgcgctg cgaatggcaa agaagtggga gacaatgttc tatactttgg atgcagacat	1740
cgcgaccagg attacattta tcaagaggaa cttgagaaat acgagcaaaa tggatgatgc	1800
aaattgaacc tagcattctc tcgtgatcaa aaagaaaaag tgtatgtaac acatttacta	1860
gaaaaagata tggatctctt atgggatgct atcggtaatc gtaatggaca tttctacatt	1920
tgcggggacg ctaagaatat ggctgttgac gtaaggaata ttgtcttaaa gactatccaa	1980
ctaaaagggtg gacgcacaga agctgaagct gcacaattta tcaagaagct tgagtctatg	2040
aagaaatatt ctgctgacgt atggagttaa	2070

<210> 22
 <211> 817
 <212> DNA
 <213> *Spodoptera littoralis*

<400> 22	
acatctggta tcgacgcaa gaacactctc tgtgagtta ccggcgatat cctgcgtact	60
cccgctctctg aagatatgtt gggctgtgta ttcaacggct ccggaaagcc cattgacaag	120
ggtcccccaa tctcgcgga ggacttcttg gacatccagg gacagcccat caacccatgg	180
tcccgatatct accccgagga gatgatccag actggtatct ccgctatcga cgtgatgaac	240
tccattgctc gtggtcagaa gatccccatc ttctctgccc ctggtctgcc ccacaatgaa	300
attgccgccc agatctgtag acaggccggg cttgttaaga tccccggcaa atcagtgttg	360
gatgaccacg aggacaactt cgccatcgta ttccgagcta tgggtgtgaa catggaaacc	420
gcccggttct tcaaacagga cttcgaagag aacggttcta tggagaacgt gtgcctgttc	480
ttgaacttgg ccaatgacct cactattgag agaattatca cccccgtct tgctttgact	540
gctgccgagt tcttggccta ccagtgcgag aaacacgtgt tggatcatct gactgacatg	600

tccatcatacg ccgaggctct gcgtgaggtg tccgccgccc gtgaggaggt acccggaacgt	660
cgtgggtttcc caggttacat gtacaccgat ttggccacca tctacgagcg tgccggacgt	720
gtagagggca ggaatggatc catcaccag atccccattc tgactatgcc caacgacgac	780
atcacccatc ctattcctga tttgacggga tatatta	817

<210> 23
 <211> 1532
 <212> DNA
 <213> *Spodoptera littoralis*

<400> 23 cattgaagcg acagctgcac tgctcgctag ttctcaagta atcattatca ggtgaaagaa	60
acgaaaatgt tggcttatat ataagttgtg aacagtgaac ctttacaata tattaatatc	120
attcaagaca tggaaaaaaaa caataaatca aagcaaatg tggaaaatat aaatactcca	180
actgcttcgg ggtcagctgc tacttcagtg gcatccaatg gccccgcctc aacattaacg	240
ctattcaaga gcggaccgcg tgaggctaaa attcgacccc tcgcgccatt aatgctcccg	300
acgcaaagtt acgactcaaa cgccggctct cgggcttcgt caccatccac ccctcgttct	360
tcactcttctt tctccatcga taaaaccgac aatcacgaca cctttggctt cagtgcggac	420
acggctgata tgagaaaaga ggatgaacgt atgaaaacat ttgaaaaatg gcccgtcagt	480
ttcctaaccg gacagcaact tgctcgaaat ggattttact acctaggccg tggagatgaa	540
gcccgttgcg ccttctgtaa agtggagatt atgaggtggg ttgagggcga tgaccctgcg	600
aaggaccatc agcggtgggc gccacagtgc ccattcgtgc gcaagctcaa cggtagtgcc	660
agcagcgaca cgggtagttc gggccaggac gaatgtggg cccgcgccac tccctccggt	720
acctctccgc cacgtatggc cgggtccgtg caccacgat atgcgtctga agccgcacga	780
ctacgtagct ttaaagactg gccacgatgc atgcggcaaa aacctgaaga actcgcagag	840
gctggctttt ttacactgg tcaggagagac aaaaccaagt gtttttactg cgatgggtgga	900
ttaaagatt gggagaacca tgacgtaccc tgggaacaac atgcacggtg gtttgaccgt	960
tgcgccctacg tgcaattggt gaagggctga gaatacgttc aaaagtgat ttctgaggct	1020
tgtgaggtat ccgcatcgga agcagaacgt gatgttgctc cctcacgaac taccagcgag	1080
tccagcgcg cagttgagac gccggagaa tcagtcgacg actcaaagtt gtgtaaaatc	1140
tgttacgagg aagagcgtaa cgtgtgcttc gtgccgtgcg gccacgtggg ggcttgcgcc	1200
aagtgcgcg tggcagccga caagtgcgcc atgtgcgcga ggacgtttca gaatgcagt	1260
cgattatatt tctcgtgaga agagccgcca atttgaaggc tcgattctag tcttaagga	1320
cggccggata gagctgtgtg ctgaaaccac gagctcgga gccacgtttc cacaggcgga	1380
gtaacctatt aaaacatatt gtttgatagt ttcgatagga actcgctcgc tagtgtagca	1440

aaagacgaaa ttgagagtcc tcaggagtaa gacagatata tttaggtata gtgaattata 1500
aaataacttag ttagcaaaaa aaaaaaaaaa aa 1532

<210> 24
<211> 5207
<212> DNA
<213> Spodoptera exigua

<400> 24
gagtgagcgc gcggcctacc gaccgaacgc acgcgcaaac catgcgcagc gacgctgtcc 60
cgcgagtgc ctcctcgta cattgtgaag tgatatacag tataaacacg gattacaaca 120
acgcttatct ccacaacata ctgaactaat attaatataa aatggcgacg tcaggaggga 180
aacggcgggga agagggcagc gataactcgc atgatgagct tacaccgctc gctaacgata 240
tttatggcgg aagccaaagg acagtacaag aaacgaaagg atgggacgtg ttccgggagt 300
ttccaccgaa gcaggacagt gggctctatgg agactcagaa atgtttggag ttcacagtgc 360
ggttgctgaa ggtgacggca tatctagtcg tcttcattgc ggtcctcggg tccggagtgc 420
tagcaaaggg cagcacgctc tttatgacat cacagctaaa aaaggacagg cggattgcgt 480
attgtaatag gaatttaggt agggataaac aatttatagt aagtcttcca gacgaggaac 540
gagtggtctg gatgtgggct attttggtcg cgttcgccat accagaaata ggaacactca 600
ttagatcagt gaggatatgc tttttcaaaa cttctagacg accgactagc acacaattcg 660
ctgtgatttt catagcggag acgttgcata cgataggaat gggctctcta ttttttttga 720
tctaccaga actggacgtg gtcaaaggag caatgattac gaactgcctt tgcataattc 780
ctgccgtttt gggcttgctc tcacgcaact ccagagattc gaaacggttc ataaaagtga 840
ttgtggacat ggcggcaata gttgcgcaag tctactggatt cattgtatgg ccactattag 900
agaataaacc tgtactatgg ttgataccag tcgcatcact atgcatatcc cttggatggg 960
gggaaaacta tgtcacacgt cagagtccga taggtataat caaaagcctt ggcagattaa 1020
aagatgaatt aaccttcact cgctactaca cgtaccgttt tatatctgtc tggaaaatct 1080
tggtcttct catgtgcatt ctcttcagca tttggctcga aggtgacgag cctgccatgt 1140
ttttccaact gttcaatgcc ggttttgac cacacagtat cgttgctgaa gaggtacaaa 1200
ttcaattagg cgggaccgct attcctgatt tagctaattg tactttaacc ggagactcag 1260
ttgaggtcgc agctgcttac aaatccgcat tctacgtgat gcttatccaa atatttgcag 1320
cgtatatctg ctacatattt ggaaagtctg cttgtaagat cctcatccaa ggcttcagtt 1380
acgcgttccc catcaatctc gtcattccat tgggtggtcaa cttgttgatt gccgcgtgtg 1440
gtatcagaaa tggtgacaat tgctatttcc atgggacagt tcccgattat ctttacttcg 1500

agagtccacc	agtgttttacg	ctaagcgatt	tcatatctcg	tcaaattggca	tggatatggc	1560
tactatggct	attgtcgcaa	acatggatca	ccatacacat	ctggacacca	aaagctgaac	1620
gtttggcctc	tacggagaag	ttattcgtga	tgccaatgta	caacggttta	cttattgac	1680
agagtatggc	cttaaacaga	aagaggaatg	atcaaagaga	tgtaagact	gaggacctcg	1740
cagaaataga	aaaagaaaaa	ggcgacgaat	actatgaaac	tatatcagtt	cacacggata	1800
acactgggtc	ttctccaaaa	gctattaagt	catcagatca	gatcaccagg	atatatgcat	1860
gcgctactat	gtggcacgaa	actaaagacg	agatgatgga	gttcttgaag	tccattcttc	1920
ggtagacga	ggatcagtgc	gctcggcgtg	tagctcaaaa	gtatttacga	gtcgttgacc	1980
ctgattacta	tgaattcgaa	acacatatct	tcttagacga	cgccttcgaa	atatcagatc	2040
acagtgaacg	tgattctcag	gtgaatcgat	tcgtaaaact	gcttggtgac	actatcgatg	2100
aagcggcttc	cgaggtacat	cagacgaaca	ttcgtattcg	accacctaa	aagtatccc	2160
cgccttacgg	aggacgattg	acgtgggtac	tgccaggaaa	gacgaagatg	atttgtcact	2220
tgaaggataa	ggcaaagatt	cgtcacagga	aacgttggtc	tcaggtgatg	tacatgtact	2280
acctactcgg	tcaccgacta	atggagctgc	caatatctgt	ggatcgtaaa	gaagttatgg	2340
ctgagaacac	ctatctgctg	accctggacg	gagacatcga	ttccaacct	catgctgtac	2400
gtttgcttat	cgatttgatg	aagaagaaca	agaatctggg	agctgcttgc	ggcgtatttc	2460
atcccgtagg	ctctggccct	atggtgtggt	atcaaattgt	cgagtatgcc	attggtcatt	2520
ggctgcaaaa	ggcaactgaa	cacatgattg	gctgtgtact	gtgtagccct	ggctgcttct	2580
ccctcttcag	aggaaaggct	ttgatggacg	acaacgtaat	gaagaagtat	acattgaggt	2640
ctgatgaagc	tcggcattac	gtacagtacg	atcaagggga	agatcgatgg	ttatgtacgc	2700
tgttacttca	acgaggttac	cgtgtagagt	actcagctgc	ctccgacgcc	tacactcact	2760
gtccogaagg	ttttaacgag	ttctacaacc	aacgtcgtcg	ttgggtgcct	tccaccatcg	2820
ccaacattat	ggacttgctt	gccgattgca	aacacaccat	caagattaac	gataacatct	2880
ccagtcctta	tatcgcatat	cagatgatgt	tgatgggtgg	tacaatcttg	ggccccggaa	2940
ctatatctct	tatgttggtg	ggtgccttcg	tgcccgcttt	ccgtattgac	aactggactt	3000
ctttcgaata	taacttgtat	cccattttga	tcttcatggt	tgtatgtttt	acgatgaaat	3060
ccgaaattca	attgctcgtg	gctcagatat	tatcgacggc	atacgccatg	attatgatgg	3120
cttttatagt	cggtaccgcg	cttcagttag	gcgaggacgg	tatcggatct	ccttcggcta	3180
tatttttgat	atcactttcg	agttcgttct	tcatagccgc	ttgcttgcat	ccgcaggagt	3240
tctggtgtat	tgtaccggga	attatttatc	ttttatctat	accctctatg	tacttgcttt	3300
tgattttata	ttcgattata	aatcttaacg	tagtatcttg	gggtactcga	gaagtagctg	3360

ttaagaagac gaagaaggaa atcgaagcag aaaagaaaga agcagaatta gcaaaaaaat	3420
cggcaaaaaca gaagtctttg ttaggtttcc ttcaaggagt aaacagcaat gaagaagaag	3480
gatctataga attctcgttc gccggtctat tcaagtgtct gttatgcacg catccaaaag	3540
gaaacgaaga gaaagtgcaa ctcttgcata ttgcatctac tctagagaag ttggaaaaga	3600
aattagaaac tgttgagagg gctgttgatc ctcacggcat tagcagagga cgtaaactgt	3660
cggttggacc aagaggtagc accactggag atcatggttt ggacgctcta gctgaaggac	3720
cagaagagga taacgactca gattctgaaa ctgacacact ttctactgtg ccaagagaaa	3780
agagagatga tctcataaac ccatactgga ttgaggatcc tgagttgaaa aagggatgaag	3840
tagacttttt gagtcccgc gaattatctt tctggaaaga tctcattgac aaatatattat	3900
accctattga tgctaacaag gaggagcagg cccgtatatc caaggatctg aaagaattga	3960
gagactcgtc tgttttttct ttctttatgg tcaatgctct ctttgtattg attgtattct	4020
tgctacaact gaacaaggac aaccttcaca ttaagtggcc cttcggagtt aaaactaaca	4080
taacatacga tgaggttact caagagggtg taatatcaaa ggaatatctg caactggagc	4140
ctattggttt agtgtttgta ttcttcttcg ccttgatcct ggtgatacag ttctccgcca	4200
tgttgttcca tagatttgga accctttcac acatattagc gtcgacagaa ctgaactggt	4260
tctgttctaa gaagtccgac gacttgtctc aagacgcact attagataag aatgcaatag	4320
caatagtaaa agacctgcag aaattgaatg gtctggacga cgattatgac aatgactcgg	4380
gctcgggtcc tcataacgtc ggcagaagaa agactattca caatttgag aaggcgagac	4440
agaagaagag gaatataggc aactggatg tggccttcaa gaagagattc ttcaatatga	4500
acgccaacga tggaccaggt acaccagttc taaatcgtaa gatgacgttg agaagggaaa	4560
cgctaaaggc tttagagacg agaaggaatt cagtgatggc ggaaagaaga aaatcccaga	4620
tgcaaacact tggtgccaat aatgaatatg gagtgacagg aatgctcaat aataacttag	4680
gtgtcggggc gcggcacagg acatctaatt ccaacatatc agtgaaagat gttttcggcg	4740
agccaaacgg aggtcaagtc aaccgaggct acgaaaccac cataggcgac gaagatgaca	4800
caaactcaat gagattacaa cctagacaaa accaagtttc cttccagggt agattctaaa	4860
agagttgcca aactaagtgc ctaggttaaa caaatgtaga tactagaaat atagactgta	4920
aaatttttta caatgaagaa tctcagcaaa tgtttgcggg aatcatgtat tgcttgat	4980
atatactttt ttttaggtcg tgacagcaat gtgctgtcat taaataccaa catcggacaa	5040
tttacagctt tattgtaaga taaaacatac gaatttacac tgccacttaa ctttacatta	5100
ttgatctttt tatacttatt taaaataata tcttttgtat taaaagattt ttgttttagt	5160
ttttatgaaa gtagacatcg aattagtgtt gtatgttttt aatgggg	5207

<210> 25
 <211> 543
 <212> RNA
 <213> *Spodoptera littoralis*

<400> 25
 cuaauacgac ucacauauagg gagaacuugg gcuuggagau gaugacgcua auauugaaga 60
 ugacuuuauac accuggaaaag aaaaguucug gccagcugua ugugagaaaau ucaauauuga 120
 gagcacuggu gaagaagagu ugauucguca guuccgucuu guuacucacg gaccugauga 180
 cauacaaccu aacaacauau uuacuggaga aaugccaga uuacacuccu uacaagucca 240
 gaggccaccu uaugaugcca agaauccauu ccuugcucaa aucacaguua auagagaauu 300
 acauaagggg ggagauaggu cuuguaucca ugucgaauug gauauuucag acuccaaaau 360
 gcgauaugaa gcaggugauc auguggcugu guacccaaua aaugacucua accuuguaga 420
 ucgucuagga caauuaacag gggccaaccu ugacgagauc uucucucuca ucaacacuga 480
 ccaggaaaagc agcaaaaagc auccuuuccc uugcccaacu cucccuauag ugagucguau 540
 uag 543

<210> 26
 <211> 533
 <212> RNA
 <213> *Spodoptera littoralis*

<400> 26
 cuaauacgac ucacauauagg gagaccaacc uugacgagau cuucucucuc aucaacacug 60
 accaggaaaag cagcaaaaag cauccuuucc cuugcccaac cuccuaucgc acugcauuau 120
 cacacuaugu ugagauuacu gcauugcccc guacucacau auuaagagag uugguugaau 180
 acuguacaga ugaagaagac aaaaagaaa ugaugcucau ggcaacuaau ucucaagagg 240
 gcaaggccau guaccaauca uuuaauugag aggcuugcag aaauauugug cacaucuuug 300
 aagauguacc aucuuguaaa ccuccacugg accacuugug ugaacuuuuu ccucgccuac 360
 aaccaagaua cuacuccauc ucauccaguc cuaagaugua uccagagaca gugcauaua 420
 cugcagucgu uguucaauau aaaacaccua cgggucgcgu caacaaaggu guuacgacaa 480
 caugguuagc agauaacaaa cccgaaccu cucccuauag ugagucguau uag 533

<210> 27
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> *Spodoptera littoralis*

<400> 27
 ctaatacgac tcactatagg gagaacttgg gcttggagat gatg 44

<210> 28
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> *Spodoptera littoralis*

 <400> 28
 ctaatacgac tcactatagg gagagttggg caagggaaag gatg 44

 <210> 29
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> *Spodoptera littoralis*

 <400> 29
 ctaatacgac tcactatagg gagaccaacc ttgacgagat cttc 44

 <210> 30
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> *Spodoptera littoralis*

 <400> 30
 ctaatacgac tcactatagg gagaggggtc gggtttggtta tctg 44

 <210> 31
 <211> 525
 <212> RNA
 <213> *Spodoptera littoralis*

 <400> 31
 cuaauacgac ucacuaauagg gagaccggaa agcccauuga caagggucce ccaauccucg 60
 ccgaggacuu cuuggacauc caggacagc ccaucaaccc auggucccg auuaccccg 120
 aggagaugau ccagacuggu aucuccgcu ucgacgugau gaacuccauu gcucgugguc 180
 agaagaucce caucuucucu gccgcugguc ugccccacaa ugaaaugcc gcccagaucu 240
 guagacaggc cggucuuguu aagauccecg gcaaaucagu guuggaugac cacgaggaca 300
 acuucgccau cguauucgca gcuauaggug ugaacaugga aaccgcccgg uucuucacac 360
 aggacuucga agagaacggu ucuauaggaga acgugugccu guucuugaac uuggccaug 420
 accccacuau ugagagaauu aucacacccc gucuugcuuu gacugcugcc gaguucuugg 480
 ccuaccagug cgagaaacac gucuuccuau agugagucgu auuag 525

 <210> 32
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> *Spodoptera littoralis*

 <400> 32
 ctaatacgac tcactatagg gagaccggaa agccattga caagg 45

 <210> 33

<211> 45
<212> DNA
<213> *Spodoptera littoralis*

<400> 33
ctaatacgac tcactatagg gagacgtgtt tctcgactg gtagg 45

<210> 34
<211> 524
<212> RNA
<213> *Spodoptera littoralis*

<400> 34
cuaauacgac ucacauuagg gagauucgug cgcaagcuca acgguagugc cagcagcgac 60
acggguaguu cgggccagga cgaauugugg gcccgcgcca cuccucccg uaccucuccg 120
ccacguauagg ccggucccg gcacccacga uaugcgucug aagccgcacg acucacguagc 180
uuuaaagacu ggccacgaug caugcggcaa aaaccugaag aacucgcaga ggcuggcuuu 240
uuuuacacug gucagggaga caaaaccaag uguuuuuacu gcgauggugg auuaaaagau 300
ugggagaacc augacguacc cugggaacaa caugcacggu gguuugaccg uugcgccuac 360
gugcaauugg ugaagggugc agaauacguu caaaagguga uuucugaggc uugugaggua 420
uccgcaucgg aagcagaacg ugauguugcu ccucacgaa cuaccagcga guccagcgcg 480
ccaguugaga cgccggagaa ucucccuaua gugagucgua uuag 524

<210> 35
<211> 44
<212> DNA
<213> *Spodoptera littoralis*

<400> 35
ctaatacgac tcactatagg gagattcgtg cgcaagctca acgg 44

<210> 36
<211> 44
<212> DNA
<213> *Spodoptera littoralis*

<400> 36
ctaatacgac tcactatagg gagattctcc ggcgtctcaa ctgg 44

<210> 37
<211> 513
<212> RNA
<213> *Spodoptera exigua*

<400> 37
cuaauacgac ucacauuagg gagauauuca ucccguaggc ucuggcccuu ugguguggua 60
ucaaauuguc gaguaugcca uuggucauug gcugcaaaag gcaacugaac acaugauugg 120
cuguguacug uguagcccug gcugcuucuc ccucuucaga ggaaaggcuu ugauggacga 180

caacguaaug aagaaguaua cauugagguc ugaugaagcu cggcauuacg uacaguacga 240
ucaaggggaa gaucgauggu uauguacgcu guuacuuaa cgagguuacc gugugagua 300
cucagcugcc uccgacgccu acacucacug ucccgaaggu uuuaacgagu ucuacaacca 360
acgucgucgu ugggugccuu ccaccaucgc caacauuaug gacuugcuug ccgauugcaa 420
acacaccauc aagauuaacg auaacaucuc caguccuaua aucgcuaacc agaugauguu 480
gauggguggu cucccuauag ugagucguau uag 513

<210> 38
<211> 713
<212> RNA
<213> Spodoptera exigua

<400> 38
cuaauacgac ucacuauagg gagacugcaa cuggagccua uugguuuagu guuuguauuc 60
uucuucgccu ugauccuggu gauacaguuc uccgccaugu uguuccauag auuuggaacc 120
cuuucacaca uauuagcguc gacagaacug aacugguucu guucuaagaa guccgacgac 180
uugucucaag acgcacuauu agauaagaau gcaauagcaa uaguaaaaga ccugcagaaa 240
uugaaugguc uggacgacga uuaugacaau gacucgggcu cggguccuca uaacgucggc 300
agaagaaaga cuauucacaa uuuggagaag gcgagacaga agaagaggaa uauaggcaca 360
cuggaugugg ccuuaagaa gagauucuuc aaauugaacg ccaacgaugg accagguaca 420
ccaguucuaa aucguaagau gacguugaga agggaaacgc uaaaggcuuu agagacgaga 480
aggaauucag ugauggcgga aagaagaaaa ucccagaugc aaacacuugg ugccaauauu 540
gaauauggag ugacaggaau gcucaauauu aacuuaggug ucgggccgcg gcacaggaca 600
ucuaaugcca acauaucagu gaaagauguu uucggcgagc caaacggagg ucaagucaac 660
cgaggcuacg aaaccaccau aggcgacgau cucccuauag ugagucguau uag 713

<210> 39
<211> 44
<212> DNA
<213> Spodoptera exigua

<400> 39
ctaatacgac tcactatagg gagatattca tcccgtaggc tctg 44

<210> 40
<211> 44
<212> DNA
<213> Spodoptera exigua

<400> 40
ctaatacgac tcactatagg gagaccaccc atcaacatca tctg 44

<210> 41
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> *Spodoptera exigua*

 <400> 41
 ctaatacgac tcactatagg gagactgcaa ctggagccta ttgg 44

 <210> 42
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> *Spodoptera exigua*

 <400> 42
 ctaatacgac tcactatagg gagatcgctg cctatggtgg tttc 44

 <210> 43
 <211> 495
 <212> RNA
 <213> *Zea mays*

 <400> 43
 uaaauacgacu cacuauaggg agauuggcga gcuuaggauu gaggaucguu uacaguggaa 60
 agaacacucu augauauucg ccaugccaaa caagccagga gaaucagcc gguuugauuu 120
 cccagaaacu uugccagcac cuauaaaugg gauaugggcc auauugagaa acaaugaaa 180
 gcuuaccugg cccgagaagg ugaaguugc aaucggacuu cugccagcaa uggguuggug 240
 ucaaccuuau guugaagcuc aagauggcuu aaccguuua gaauggauga aaaagcaggg 300
 uguuccugau cgggugaacg augagguuuu uauugcaaug uccaaggcac ucauuuau 360
 aaauccugau gagcuauca ugcagugcau uuugauugcu ugaaccgau uucuucagga 420
 gaagcauggu ucuaaaaugg cauucuugga ugguaauccg ccugaaaggc uaucuccua 480
 uagugagucg uauua 495

 <210> 44
 <211> 593
 <212> RNA
 <213> *Zea mays*

 <400> 44
 uaaauacgacu cacuauaggg ugaucgggug aacgaugagg uuuuuauugc aauguccaag 60
 gcacucaauu ucauaaaucc ugaugagcua ucuaugcagu gcauuuugau ugcuuugaac 120
 cgauuuuuc agggagaagca ugguuuuaa auggcuuu uggauuguaa uccgccugaa 180
 aggcuaugca ugccuauugu ugaucacauu cggucuaggg guggagaggu ccgccugaa 240
 cucguauuaa aaagauagag cugaauccug auggaacugu aaaacacuuc gcacuuagug 300
 auggaacuca gaaacugga gaugcuuauu uuugugcaac accagucgau aucuuaagc 360

uucuuguacc ucaagagugg agugaaaaua cuuauuucaa gaaacuggag aaguuggugg 420
 gaguuccugu uaucaauguu cauauauggu uugacagaaa acugaacaac acauaugacc 480
 accuucuuuu cagcaggagu ucacuuuuuaa gugucuaugc agacauguca guaaccugca 540
 aggaauacua ugacccaaac cguucaaugc uggcccuaua gugagucgua uua 593

<210> 45
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> artificial Sequence

<220>
 <223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 45
 gattgctgga gcaggattag 20

<210> 46
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> artificial Sequence

<220>
 <223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 46
 cccttgctc aagcaatatg 20

<210> 47
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> artificial Sequence

<220>
 <223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 47
 accacttoga ccgccactac t 21

<210> 48
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> artificial Sequence

<220>
 <223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 48
 acgcctaagc ctgctggtt 19

<210> 49
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> artificial Sequence

<220>
 <223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

 <400> 49
 accggcatca gctcagtctc 20

 <210> 50
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> artificial Sequence

 <220>
 <223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

 <400> 50
 tgctgttctc tgggcacagg 20

 <210> 51
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> artificial Sequence

 <220>
 <223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

 <400> 51
 tccccctcaga tattaacaac 20

 <210> 52
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> artificial Sequence

 <220>
 <223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

 <400> 52
 aggaggaaag gcagcttctg tg 22

 <210> 53
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> artificial Sequence

 <220>
 <223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

 <400> 53
 gtgactcgtc accaacaag 20

 <210> 54
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> artificial Sequence

 <220>
 <223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 54	
tgtgttgtcc gttgagactg	20
<210> 55	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> artificial Sequence	
<220>	
<223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA	
<400> 55	
tcggaagccg taccttcgtg	20
<210> 56	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> artificial Sequence	
<220>	
<223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA	
<400> 56	
cctggagctg ctgctttgtg	20
<210> 57	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> artificial Sequence	
<220>	
<223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA	
<400> 57	
taccagcggt cgagtgggtc	20
<210> 58	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> artificial Sequence	
<220>	
<223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA	
<400> 58	
gaagagggcg tgcaaattggg	20
<210> 59	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> artificial Sequence	
<220>	
<223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA	
<400> 59	

ctattgcgtg tgctccaaac 20

<210> 60
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial Sequence

<220>
<223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 60
acatgaggag gaaccaaagg 20

<210> 61
<211> 490
<212> RNA
<213> artificial Sequence

<220>
<223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 61
cuaauacgac ucacuaauagg gagaggcuca agaaccaguu uauguuaaug cuaagcagua 60
ucgaagggauc cugcagcgaa gacagucacg ugcuaaagca gaacuugaaa agaagcaaa 120
aaaggguaaga aagccauauc uucacgaguc ucgacaucag caugcacuga ggaggguaag 180
ggccucgggu ggacguuuug ccaaaaagac agaugcuucu aaggguaucug guucugugag 240
uucaucgggu ucugaaccuu ugcaguucua ugcugcugau auucaaaga ggaugaaaa 300
uggaagguug gccgagcuuc agcagucuaa uucaaauggu agcaguuaug gcaaucaaag 360
uagcuuucua gaauccaagg augaguacca guuugcuaaa agcagggaag gagguuuuuu 420
ugucaaguaa uuggagauac guucaugugu aaacuagcuc uugcccucuc ccuauaguga 480
gucguauuag 490

<210> 62
<211> 497
<212> RNA
<213> artificial Sequence

<220>
<223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 62
cuaauacgac ucacuaauagg gagagcaguu auggcaauca aaguagcuuu caagaaucca 60
aggaugagua ccaguugcu aaaagcaggg aaggagguuu uuuugucaag uaauggaga 120
uacguucaug uguaaaacuag cucuugcccu gcaacgaggg uagaguauga gcaagaggag 180
uuuacaggga uuguuucauu ucuuggcuuu ucaagauagg cggcaauuca uucuggcuu 240
uuuacuuuag uguuaaaggg agcaacagag gugacgaggg uaucaguguu gcagcauuug 300

cuuggagauu acaucuucc uuauguacag agauggauga acuuagaacu aggauuagaa 360
 aguuuuucag uaaguuuug uuuggccagu uacuguaguu uuaguuuagg agaccaugua 420
 aaaagguugu uaguuuugca aaaggauuuuuuuuuucc cuuuuuggug cauucucccu 480
 auagugaguc guauuag 497

<210> 63
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> artificial Sequence

<220>
 <223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 63
 cgagtcggga tactggaagg 20

<210> 64
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> artificial Sequence

<220>
 <223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 64
 cttcttcatg ccgacgaggg 20

<210> 65
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> artificial Sequence

<220>
 <223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 65
 acgatgggcg agaaggagtg 20

<210> 66
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> artificial Sequence

<220>
 <223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 66
 tcagtcccgt cgggtacttg 20

<210> 67
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> artificial Sequence

<220>
 <223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 67
 agggtcacat cccgaactac 20

<210> 68
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> artificial Sequence

<220>
 <223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 68
 acctcgtcag tctccacatc 20

<210> 69
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> artificial Sequence

<220>
 <223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 69
 gttggattcg agcttccttc 20

<210> 70
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> artificial Sequence

<220>
 <223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 70
 tgctgctgct cactagctac 20

<210> 71
 <211> 490
 <212> RNA
 <213> artificial Sequence

<220>
 <223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 71
 cuaauacgac ucacuaauagg gagacaguucc guuggccuag uuccuaauugg agaucuguga 60
 agguugguug ggaugaaucac acugcagggg aaagaccacc aagaguuuu uuaugggaaa 120
 uugaaccauu gacaaccuuu ccaauguau ccaucucuguu cccacugaga guuaagcauc 180
 cuugguauuc aggaguugcu ucccugcaug augacagcaa ugcuuuaaug uggcugagag 240
 gaguugcugg ugagggaggu uuucagucuc ugaacuuuca gucaccuggu auuggcuccu 300

ggggacaaca gaggcuccau ccauccuac ugagcagcga ucacgaucag uaccaagcag 360
uaguugcugc ugcugcugcu ucccaaucug gugguuacuu aaaacagcaa uucuugcacc 420
uucagcaacc uaugcagucc ccucaagaac acugcaaccu caaccucuc ccuauaguga 480
gucguauuag 490

<210> 72
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial Sequence

<220>
<223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 72
ctcagccatg ggatactacc 20

<210> 73
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial Sequence

<220>
<223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 73
gctggccggtt gacgacattg 20

<210> 74
<211> 18
<212> DNA
<213> artificial Sequence

<220>
<223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 74
acctcaggtg gatgtctc 18

<210> 75
<211> 18
<212> DNA
<213> artificial Sequence

<220>
<223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 75
tgctggtgct ttgggtag 18

<210> 76
<211> 530
<212> DNA
<213> Zea mays

<400> 76
taccatgcca tccttaggag gaggcagaca cgtgctaaac tggaggcgca aaacaagatg 60
gtgaaaggta ggaagccgta ccttcgtgag tctcgacacc gtcatgccaat gaagcggggc 120
cgtggctcag gagggcggtt cctcaacaca aagcagcagc tccaggagca gaaccagcag 180
taccaggcgt cgagtgggtc aatgtgctca aagaccattg gcgacagcgt aatctcccaa 240
agtggcccca tttgcacgcc ctcttctgac gctgcagggtg cttcagcagc cagccaggac 300
cgcggtgct tgccctcggg tggcttccgc cccacagcca acttcagtga gcaagggtga 360
ggcggtcga agctgggtcgt gaacggcatg cagcagcgtg tttccaccat aagggtgaaga 420
gaagtgggca cgacaccatt cccaggcgcg cactgcctgt ggcaactcat ccttggtttt 480
tgaaactatg aatatgcaat ggacatgtag ctttgagttc ctcagaataa 530

<210> 77
<211> 40
<212> DNA
<213> artificial Sequence

<220>
<223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 77
taatacgact cactataggg ccgcatgcca ttgtccatcc 40

<210> 78
<211> 40
<212> DNA
<213> artificial Sequence

<220>
<223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 78
taatacgact cactataggg tgcatgccgt tcacgaccag 40

<210> 79
<211> 40
<212> DNA
<213> artificial Sequence

<220>
<223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 79
taatacgact cactataggg caaatagtcc gggttatgttg 40

<210> 80
<211> 42
<212> DNA
<213> artificial Sequence

<220>

<223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 80

taatacgact cactataggg gctacatgtc cattgcatat tc

42

<210> 81

<211> 936

<212> RNA

<213> Oryza sativa

<400> 81

ucaguguuug ucccucaga uauuaacaac aaugauaguu guggggagcg ggaccauggc 60

acuaagucgg uauugucuuu ggggaacaca gaagcugccu uuccuccuuc aaaguucgau 120

uacaaccagc cuuuugcaug uguuucuuau ccuauggua cugauccaua uuauggugga 180

guaucaacag gauacacuuc acaugcauuu guucauccuc aaauuacugg ugcugcaaac 240

ucuaggaugc cauuggcugu ugauccuucu guagaagagc ccuaauuugu caaugcaaag 300

caauacaauug cgauccuuag aagaaggcaa acgcgugcaa aauggaggc ccaaaaauag 360

gcgugugaaag gucggaagcc uuaccuccau gaucucgac aucaucaugc uaugaagcga 420

gcccugggau cagguggucg guuccuuacc aaaaaggagc ugcuggaaca gcagcagcag 480

cagcagcagc agaagccacc accggcauca gcucagucuc caacagguag agccagaacg 540

agcggcgug cguuguccu uggcaagaac cugugcccag agaacagcac auccugcucg 600

ccaucgacac cgacaggcuc cgagaucucc agcaucucu uugggggcgg caugcuggcu 660

caccaagagc acaucagcuu cgcauccgu gaucgccacc ccacaauaga ccagaaccac 720

cguguccccg ucaugaggug aaaaccucgg gaucgcggga cacgggcggu ucugguuuac 780

ccucacuggc gcacuccggu gugcccgugg caauucaucc uuggcuuauag aaguaucua 840

cugauaaauag ucugcuguca guuuauaugc aaugcaaccu cugucagaua aacucuuaua 900

guuuguuuua uuguaagcua ugacugaacg aacugu 936

<210> 82

<211> 43

<212> DNA

<213> artificial Sequence

<220>

<223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 82

taatacgact cactataggg ctgcctttcc tccttcaaag ttc

43

<210> 83

<211> 40

<212> DNA

<213> artificial Sequence

<220>
 <223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 83
 taatacgact cactataggg tgctgttctc tgggcacagg 40

<210> 84
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> artificial Sequence

<220>
 <223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 84
 taatacgact cactataggg cattggctgt tgatccttct g 41

<210> 85
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> artificial Sequence

<220>
 <223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 85
 taatacgact cactataggg ttcgttcagt catagcttac 40

<210> 86
 <211> 512
 <212> RNA
 <213> Oryza sativa

<400> 86
 caugguggcu cagcggcugg ggcaccaaugg cuccaccacc cagccuuuga gcucaccuca 60
 gguggauguc ucgcgggagu cgccaccgac uccagcugug cucucucucu ucugucaacu 120
 cagccauggg auacuacca aagcaccagc agccacaacc gguccccgcc aaugucguca 180
 acggccagcg ccuucggagg cggcaacaac cgggugucgc ccucggucau ggcaagcaac 240
 uacauggcgg cgagccccgg cuggaacagc uccagccggg gccaugacgg cgccaggaac 300
 gugcaccugc cgccaccgca cgggguugug cugaacgagg ucccuccggg cucuguccac 360
 cacggccauu ucuccggcga gcucgagcuc gcacugcagg gaggugcccc guccaaccgg 420
 ccggaagcca agcauggcuc cggcagcggc gccuucagcc acuccaccaa ugccaugaac 480
 uggucucugu agagaccuu gaucaucuuc uu 512

<210> 87
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> artificial Sequence

<220>

<223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 87
taatacgact cactataggg tcacctcagg tggatgtctc 40

<210> 88
<211> 40
<212> DNA
<213> artificial Sequence

<220>
<223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 88
taatacgact cactataggg cattggtgga gtggctgaag 40

<210> 89
<211> 44
<212> DNA
<213> artificial Sequence

<220>
<223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 89
taatacgact cactataggg ccaatgctcc accaccagc cttt 44

<210> 90
<211> 43
<212> DNA
<213> artificial Sequence

<220>
<223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 90
taatacgact cactataggg agttcatggc attggtggag tgg 43

<210> 91
<211> 840
<212> RNA
<213> Zea mays

<400> 91
auggaaggaa acgguggcgc gggcggcggg agcggaagcg cggcaccgcc cugggaucuc 60
gccaugcacu gggcacccgc cguagugucg uccuaccgc cgcagcccuu ggagcugcag 120
cagcaggagc uuaccugccu caagcugggg aagcggcccg ccugcugcug ggcaggggcg 180
ccgggcaacc aagcggcgca gguccacggc aauggcggcg cugguggcgc agcugcugag 240
gguaagagga aggacaaggc gccugccgcg gcggccguga cgaggugcca gguggagggg 300
ugccaccugu cgcuggcgga cgccaaggag uaccaccggc ggcacaaggu gugcgaggcg 360
cacuccaagu cgccccgggu cgucguccuc ggcgccgagc agcgcuucug ccagcagugc 420

agccgguucc acgcgaucuc ggaguucgac gacgcgaagc ggagcugccg acggcgucug 480
gccgggcaca acgagcggcg gcggaagagc aacgccagcg aggccauggc aagaggcguc 540
gcgcacccac acggagugac ggcuuucggc cacggcgggcu uccugcccuc gcgcggccuc 600
gucccccagc ggucgucccc ggcgggcggu ggugcucucu cucuucuguc aucggccaga 660
ggcagcgugg cgggcgccag cggggcccugg cuggucacgg cggcgcgga ggacaucacg 720
gcgcgcucca gcgcggcgcu cgacgaccuu aucgccgaga accgcgccgc cgcgccucuc 780
gcgcggcagu acuucgucuc cgaccgcucg ccggcgccca gacgggauuu cgucgccucu 840

<210> 92
<211> 40
<212> DNA
<213> artificial Sequence

<220>
<223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 92
taatacgact cactataggg cgccgtagtg tcgtctacc 40

<210> 93
<211> 40
<212> DNA
<213> artificial Sequence

<220>
<223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 93
taatacgact cactataggg aaagccgtca ctccgtgtgg 40

<210> 94
<211> 38
<212> DNA
<213> artificial Sequence

<220>
<223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 94
taatacgact cactataggg cgcaggtcca cggcaatg 38

<210> 95
<211> 41
<212> DNA
<213> artificial Sequence

<220>
<223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 95
taatacgact cactataggg cggtcggaga cgaagtactg c 41

<210> 96
 <211> 800
 <212> RNA
 <213> Oryza sativa

<400> 96
 augagcggga ugaauucgcu gagcauggug gaggcgaggc ugccgccggg guucagguuc 60
 caccgcgag acgacgagcu cgugcuggac uaccugaaa ggaagcuccu cgacggcggc 120
 gugggcggcg ccgcggcggc ggcggcggcg gucaccauc acggcugccc ggugaugguc 180
 gacgucgauc ucaacaagug cgagccaugg gaccuuccug agaucgcuug cguugguggc 240
 aaggaguggu acuucuauag ccuuagggau aggaaguaug caacuggcca acgaacaaau 300
 agagcaaccg aaucgggcua cuggaaggcc acaggaaaag aucgccaau aagccgaaa 360
 ggauugcucg ucgguaugcg aaaaaccug guguuuaca aagguagagc ccuaagggg 420
 aagaagaccg aguggguc au gcaugaauuc cgcaaagaag gacaagggga uccgaugaag 480
 uugccucuca aggaggacug ggucuugugu agagucuucu acaagaguag gacaaccau 540
 gccaagcugc caacggaggg uagcuacaac aaauaugaca guguggccac aacuucacug 600
 ccucccuca cugacaacua cauugcauuu gaucagccug guucaaugca aaaccuagag 660
 gguuaugagc aagugcccug cuucuccaau aauccucuc aacagccauc gucgucgaug 720
 aauguuccgu ugacaucggc caugguugau caagagcaaa acaauauggg uagggcgau 780
 aaggaugugc ugagccaau 800

<210> 97
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> artificial Sequence

<220>
 <223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 97
 taatacgact cactataggg ttcaggttcc acccgcgaga c 41

<210> 98
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> artificial Sequence

<220>
 <223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 98
 taatacgact cactataggg ccgttggcag cttggcaatg g 41

<210> 99
 <211> 41

<212> DNA
<213> artificial Sequence

<220>
<223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 99
taatacgact cactataggg cgtgctggac tacctggaaa g 41

<210> 100
<211> 40
<212> DNA
<213> artificial Sequence

<220>
<223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 100
taatacgact cactataggg caaccatggc cgatgtcaac 40

<210> 101
<211> 799
<212> DNA
<213> Zea mays

<400> 101
atggagcacg acgtgcacca ccagcaggcc atggagctgc cgccgggggtt ccgattccac 60
cccaccgacg aggagctcat cacgcactac ctgccagga aggccgccga cgcccgttc 120
gccccgcgcg ccgtcggcga ggccgacctc aacaagtgcg agccatggga cctgccatcc 180
cgggcgacga tgggcgagaa ggagtgttac ttcttctgcg tcaaggaccg caagtaccgc 240
acgggactga ggacgaaccg ggccaccgag tcgggatact ggaaggcgac gggcaaggac 300
agggagatct tcaggagcaa ggccctcgtc ggcatgaaga agacgctcgt cttctacacg 360
gggagggcgc ccaggggagg caagaccggc tgggtcatgc acgagtaccg cctccacggc 420
aagcacgccg gcagcagccg cctcatgcog tcgtcgggtca gagctggcgc gtcaaaggac 480
gagtgggtgc tgtgcagggt gttcaagaag agcatcgagc cgccgccgtc agtgggcaag 540
aggctcgtcg tcgctgttac ggggatgatg ttggtggagg acgtcgtggg accgccgtcc 600
atgtccatgg aggacgacct cgccgcgtgc gcgctgcctc cgctgatgga cgtgtccggc 660
ggtggcggcg ccaacatggc ggccggtcc atcgagctgc tggcgccacc ggcaccacac 720
gtgacctgct tctccaacgc gctggagggc cagttcttcc tgaaccacc ctgcctccac 780
ccctccacgt cgccgtcc 799

<210> 102
<211> 40
<212> DNA
<213> artificial Sequence

<220>
 <223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 102
 taatacgact cactataggg ccaccgacga ggagctcatc 40

<210> 103
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> artificial Sequence

<220>
 <223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 103
 taatacgact cactataggg cgacgtcctc caccaacatc 40

<210> 104
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> artificial Sequence

<220>
 <223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 104
 taatacgact cactataggg aggccgacct caacaagtg 39

<210> 105
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> artificial Sequence

<220>
 <223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 105
 taatacgact cactataggg tcaggaagaa ctggcctcc ag 42

<210> 106
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> artificial Sequence

<220>
 <223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 106
 cctcaacagt cctggatgtc 20

<210> 107
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> artificial Sequence

<220>
 <223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 107
cccgtaagtt ggaagtgatg 20

<210> 108
<211> 506
<212> RNA
<213> artificial Sequence

<220>
<223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 108
cuaauacgac ucacuaauagg gagagcuucu ccucccuaca acugugucua acgucgcuac 60
uacaucaauu gaugcugaua uauccucua u gccacuaggg acuucuggau uuccgaauc 120
cuuguauagu uaugugcaag auucuacuga cuuguugcau aauguagggc aagcugaugc 180
acaaacugug ccccgua uugucaaggu uuacaaauca gcgucccuug ggaggucuu 240
ggacauca cu gguucaaca gcuaucuga gcugcgacag gaauuagggc agauguucgg 300
uaucaaggg uugcuugaag acccucaaag aucaggcugg cagcuuguau uuguugacag 360
ggagaaugau guccuucucc uuggagacga uccgugggag gaauuuguca auauguuug 420
guacaucaaa auucuucac ccgaggaugu gcagaaacug gggaaagagg agguuggauc 480
ccucuccua uagugagucg uauuag 506

<210> 109
<211> 544
<212> RNA
<213> artificial Sequence

<220>
<223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 109
cuaauacgac ucacuaauagg gagaugggag auugagccu u gacuacuuu uccgaugau 60
ccaucucuuu uuccucuaag gcuaaagagg ccuucuauc aaggaaccuc aucuauacag 120
gauaguaaca augaagcuau uauucgaug ucaugguuaa gagggaaugc uggugagcua 180
ggacaucauu caaugaau cu agucuuuu ggcaugcuuc cuuggaugca acagagaguc 240
gauucaacaa uucucccaaa ugauuuuau cagcacuauc aagcuau ggcuaucggc 300
uugcaaaguu uugggagugg agauuuacug aaacagcau uaaugcaguu ucagcagccu 360
guccaauauc ugcaacaugc aaguacugag aaaucauuu ugcaucagca gcagcagcag 420
cagcagcaaa uaaugcagca agcaguuc au cagcauagc ugccugcuca aacccaaug 480
cugucagaga accucaaag gcaauccag caucaaucca ucuccuaua gugagucgua 540
uuag 544

<210> 110
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> artificial Sequence
 <220>
 <223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA
 <400> 110
 gaggcacctt gtgttgattg 20

<210> 111
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> artificial Sequence
 <220>
 <223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA
 <400> 111
 caaagccacg gttcttaagc 20

<210> 112
 <211> 511
 <212> RNA
 <213> artificial Sequence
 <220>
 <223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA
 <400> 112
 cuaauacgac ucacuaauagg gagauccagg uccaaugaaa caaccuuaug uuccuccuca 60
 cuauguaucu gcccccgga ccaccacggc gcgguaggucg acuggucuuu gucauuguuu 120
 ugaugacccu gcuaacuguu uaguuaacuag uguuugcccu uguaucaccu uggacagau 180
 uucugaaaau cuaaacaag gaacaacuuc augugggagu agaggugcau uauauuguuu 240
 gcugggauug acaggauugc cuagccuaua uuccugcuuc uacaggucua aaaugagggg 300
 gcaauaugau cuggaagagg caccuugugu ugauugucuu guacauguau ucugugaacc 360
 uugugcucuu ugccaagaau acagagagcu uaagaaccgu ggcuuugaua ugggaauagg 420
 guggcaagcu aaauaggaua gacaaagccg aggaguuacc augcccccua aucaugcagg 480
 caugaccucu ccuauagug agucguauua g 511

<210> 113
 <211> 513
 <212> RNA
 <213> artificial Sequence
 <220>
 <223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA
 <400> 113

cuaauacgac ucacuauagg gagaagcucc ugaacccauc auugaagaac cagugcuuag	60
ccuugaacca guugcagcag ccauuucgau gaugucuggc agugagaacg uaauggauga	120
aacuauagag guugcagaua ucagcgacau ucagaaugac ucucuuuuua gcgaaguauu	180
auacgagugc gagaaggaac ucauggagaa guccgcaauc gaagagacua uuucugaacu	240
gcuggacguc aagauuccua ugcugcaagu ggaagaguuc ccuagggaaa cccaaguaca	300
acuaccggcc auggagaagg agaagccauc aguuccugaa uguuguuac uccagaaaag	360
ugucaguucu gggugccuca acucagcuga uuggaucaau ggaccagcca ggccaaacu	420
ccuggacuuc caaggauugg acuuugagac agcguuuggg uugaggaggg cauacagcga	480
aggagacauu cucccuauag ugagucguau uag	513

<210> 114
 <211> 524
 <212> RNA
 <213> artificial Sequence

<220>
 <223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 114	
cuaauacgac ucacuauagg gagacaugga gaaguccgca aucgaagaga cuauuucuga	60
acugcuggac gucaagauuc cuaugcugca aguggaagag uucccuaggg aaaccaagu	120
acaacuaccg gccauggaga aggagaagcc aucaguuccu gauguuguu cacuccagaa	180
aagugucagu ucugggugcc ucaacucagc ugauuggauc aauggaccag ccaggccaaa	240
cuuccuggac uucaaggau uggacuuga gacagcguu gguugagga gggcauacag	300
cgaaggagac auucagaau uuggagcuag caccucgca cccgggaacu caggaaacgc	360
ucaauuagca ucuugcgaga ggcuuuaac caucagugac cugaaaucug aagaaaggaa	420
gcagaagcua ucuagguaca gaaagaagaa ggugaagaga aacuuuggca gaaagaucaa	480
guaugcuugc aggaaggcuc ucucccuaua gugagucgua uuag	524

<210> 115
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> artificial Sequence

<220>
 <223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 115	
gtgactcgtc accaacaag	20

<210> 116
 <211> 20
 <212> DNA

<213> artificial Sequence

<220>

<223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 116

tgtgttgtcc gttgagactg

20

<210> 117

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial Sequence

<220>

<223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 117

cagttcgcg acaccattcg

20

<210> 118

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial Sequence

<220>

<223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 118

gcagcatgaa cggctccaag

20

<210> 119

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial Sequence

<220>

<223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 119

tccgcaatgc cgtgtgcatc

20

<210> 120

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial Sequence

<220>

<223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 120

gcggcaggaa tgctagtgtc

20

<210> 121

<211> 543

<212> RNA

<213> artificial Sequence

<220>

<223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 121

```
cuaauacgac ucacuaauagg gagagcccac uucuacgagu ccugcccccua ccucaaguuc      60
gccacauuca ccgcaaaauca agccauccuc gaggcuuucg ccggcugcca ccgcguccac      120
gucgucgacu ucggcaucaa gcaggggaug caauggccag cucuccucca ggcccucgcc      180
cuucgucggg ggggcccccc aucguuccgc cucaccggcg ucggcccccc gcagccggac      240
gagaccgacg ccuugcagca gguggguugg aagcuugccc aguucgcgca caccuucgc      300
gucgacuucc aguaccgggg acucgucgcc gccacucucg cggacuugga gccguucaug      360
cugcagccgg agggcgaggc ggacgcgaac gaggagccug aggugaucgc cgucaacucg      420
guguucgagc ugcaccggcu gcucgcgcag cccggcgcg cggagaaggu ccugggcacg      480
gugcagcgcg ugcggccaag gaucgucacc gugguagagu cucccuauag ugagucguau      540
uag                                          543
```

<210> 122

<211> 547

<212> RNA

<213> artificial Sequence

<220>

<223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 122

```
cuaauacgac ucacuaauagg gagaauaucu acaaccgga cuggcauuau ucauguggaa      60
caaaagacua caaauuacug auggauaagu uucgccuugu cuccacggcu uucuuggagc      120
uuggucaagg uuaucaagag gcaauugaag aaaucaacuag gcuaauggga gcaggaauagg      180
caaaauuuau cugcaaggag guugaaacug uugaugacua caaugaguac ugucacuauug      240
uagcagggcu aguggggguau gggcuuucca ggcucuauca ugcugguggg acggaagauc      300
uggcuucaga uucacuuuca aaaucaaugg gcuuguuuuc gcagaaaauc aaauaaauua      360
gggaauuuuu ggaggacaua aacgagauac caaagucacg uauguucugg ccucgagaaa      420
uauggaguaa auaugucaau aaacucgagg auuugaaaau cgaggaaaau ucagaaaagg      480
caguucagug uuugaaugau auggugacua acgcucuguc uaucucuccu auagugaguc      540
guauuag                                          547
```

<210> 123

<211> 455

<212> RNA

<213> artificial Sequence

<220>

<223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 123
cuaauacgac ucacuaauagg gagacgcucu gucucaugcu gaagacugcc uccaauacau 60
gucagcauug aaggaucaug ccauuuuccg uuuuugugca auaccucaga uaauggcaau 120
ugggacaugu gcuauuugcu acaauaauugu gaaugucuuu agaggaguug uuaagaugag 180
gcgugggcuc acugcacgag uaaauugaug gacaaacaca augucagaug ucuauacugc 240
uuucuaugag uucucuucgc ugauagaauuc gaagauugau aaauauggauc caaauugcuuc 300
ccuaacgcgg aaacguguug augcgauaaa gagaaccugc aagucaucuu gcucacuaaa 360
gagaagggga uacgauuugg agaagucaaa guacaacucc augcugauaa ugguuguacu 420
ucuguuggug gcucuccua uagugagucg uauua 455

<210> 124
<211> 480
<212> RNA
<213> Aqueoria victoria

<400> 124
cuaauacgac ucacuaauagg gcgagccaac acuugucacu acuuucucuu augguguuca 60
augcuuuuca agauaccag aucauaugaa gcggcacgac uucuucaaga gcgccaugcc 120
ugagggauac gugcaggaga ggaccaucuc uuucaaggac gacgggaacu acaagacacg 180
ugcugaaguc aaguugagg gagacacccu cguaacagg aucgagcuua agggaauga 240
uuucaaggag gacggaaaca uccucggcca caaguuggaa uacaacuaca acuccacaa 300
cguaauacau acggcagaca aacaaaagaa uggaaucaaa gcuaacuua aaauuagaca 360
caacauugaa gauggaagcg uucaacuagc agaccuuau caacaaaaua cuccuauugg 420
cgauggcccu guccuuuac cagacaacca uuaccuucgc ccuauaguga gucguauuag 480

<210> 125
<211> 18
<212> DNA
<213> artificial Sequence

<220>
<223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 125
atggctgttg acgtaagg 18

<210> 126
<211> 19
<212> DNA
<213> artificial Sequence

<220>
<223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 126	
tgacagcttca gcttctgtg	19
<210> 127	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> artificial Sequence	
<220>	
<223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA	
<400> 127	
accgtcgtac tggtaaattcc	20
<210> 128	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> artificial Sequence	
<220>	
<223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA	
<400> 128	
tggcggcatc tccagatttg	20
<210> 129	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> artificial Sequence	
<220>	
<223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA	
<400> 129	
ctggtcgtac caccggtat	19
<210> 130	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> artificial Sequence	
<220>	
<223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA	
<400> 130	
gcagagcgta accttcgtag	20
<210> 131	
<211> 547	
<212> RNA	
<213> artificial Sequence	
<220>	
<223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA	
<400> 131	
cuaauacgac ucacuaauagg gagaauagccc ugguucaagg gauggaacgu ugagcgcaag	60

gaaggcaagg cugaagguaa augccucauu gagggcccucg acgccauccu gccccucgcu	120
cgccccacag acaagccccc gcgucuuccc cuccaggacg uauacaaaau cggugguauu	180
gguacggugc ccguaggcag aguugaaacu gguauccuca agccugguac caucgucguc	240
uucgcccccg ccaacaucac cacugaaguc aagucugugg agaUGCacca cgaagcucuc	300
caagaggccg uacccgguga caacguuggu uucaacguaa agaacguuuc cgucaaggag	360
uugcgucgug guuacgucgc uggugacucc aagaacaacc caccaaggcg cgccgccgau	420
uucacagcac aggucaucgu gcucaaccac ccugguacaa ucucaaacgg auacacaccu	480
gugcuggauu gccacacagc ccacauugcc ugcaaguucg cugucucccu auagugaguc	540
guauuag	547

<210> 132
 <211> 509
 <212> RNA
 <213> artificial Sequence

<220>
 <223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 132	
cuaauacgac ucacuaauagg gagaggccca ggaaaugggu aaggguuccu ucaaaucgc	60
cuggguauug gacaaacuga aggcugagcg ugaacguggu aucaccauug auauugcucu	120
guggaaguuc gaaaccgcua aaucuaugu caccauuauu gacgcucccg gacacagaga	180
uuucaucaag aacaugauca cuggaaccuc ccaggccgau ugcgccguac ucauugucgc	240
cgcugguacc ggugaauucg aggcugguau cucgaagaac ggacagaccc gugagcacgc	300
ucugcucgcu uucacacucg gugucaagca gcugauugug ggcucaaca aaauggacuc	360
cacugagccc ccuacagcg aaucgguuu cgaggaaauc aagaaggaag uguccuccua	420
caucaagaag aucgguuaca acccagcugc ugucgcuuuc guacccauuu cuggcuggca	480
cggagucucc cuauagugag ucguauuag	509

<210> 133
 <211> 502
 <212> RNA
 <213> artificial Sequence

<220>
 <223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 133	
cuaauacgac ucacuaauagg gagaauaggcu ccggcaugug caaggccggu uucgccggcg	60
acgacgcgcc ccgcgccguc uucccaucca ucguaggucg cccucgucac caggguuguga	120
ugguugguau gggucagaag gacuccuacg uaggcgauga ggcccagagc aagagaggua	180

uccucacccu gaaguacccc aucgagcacg guaucaucac caacugggac gacauggaga 240
 agaucuggca ccacaccuuc uacaacgagc ugcgcgucgc ccugaggaa caccagucc 300
 uccugacuga ggcucuccuc aaccuaagg ccaacaggga gaagaugacc cagaucaugu 360
 uugagaccuu caacucuccc gccauguacg ucgccaacca ggcugugcuc ucucuguacg 420
 ccucuggucg uaccaccggu aucguccugg acuccgguga uggugucucc cacaccguuc 480
 ucccuauagu gagucguauu ag 502

<210> 134
 <211> 592
 <212> RNA
 <213> artificial Sequence

<220>
 <223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 134
 cuaauacgac ucacuaauagg gagugucaac augggucaga uaaccagagc uaccugccca 60
 augaaccuug ccuugcggu cgucgccgag cugcagacc ucacuguugg ugggcugauc 120
 aacgguuacg gcaucgaggg gagcucucac cucuauggcc uuuucuccga cacgguguc 180
 gcgauggagg uuguucucgc agauggccgg gucgucagag ccaccaagga caacgaguac 240
 ucugaccuuu ucuauggaau uccuggucc cagggaacac uggguuccu ugucucugca 300
 gagaucaagc ugaucuccau caaggaguac augaagcuca ccuacacucc agucaagggg 360
 ggucuaaagg agaucgcga ggccuacgag gauucuuucg cuccgaggga cggugacccg 420
 gcaaaggucc cugacuuguu ugaagggaug guguacacag agagcgaggg ugucaugaug 480
 acgggcgugu acgcuucgaa agaagaggcg aagaagaagg gcaacaagau caacugcgug 540
 gggugguggu uuaagcccug guucuaccuc ucccuauagu gagucguauu ag 592

<210> 135
 <211> 598
 <212> RNA
 <213> artificial Sequence

<220>
 <223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 135
 cuaauacgac ucacuaauagg gagagcgagu uuguggagua caucccgacg agggaguacu 60
 accaccggca caccggugc cuguacuggg aggggaagcu gaucugccc uccggcgacc 120
 aguucugguu cagguuccug cugggcuggc ugaugccacc gaaggugucc cugcugaagg 180
 cgaccaggg cgaggcuauc aggaacuacu accacgacaa ccaugugauc caggacaugc 240
 uggugccgcu guacaagguu ggggaugcgc uggaguucgu gcaccgagc auggaggugu 300

auccucugug gcugugcccu caccggcugu acaagcugcc ggugaagacg augguguacc 360
 cggagccugg guucgagcac cagcacaggc agggcgacgc gagcuacgca cagauguuca 420
 cggacguggg cguguacuac gccccgggg cgugugcugag gggggaggag uucaacggcg 480
 cggagggcugu gcacaggcug gagcaguggc ugaucgagaa ccacagcuac cagccgcagu 540
 acgcgggugc ggagcugaac gagaaggacu ccugucuccc uauagugagu cguaauag 598

<210> 136
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> artificial Sequence

<220>
 <223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 136
 atggctgttg acgtaagg 18

<210> 137
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> artificial Sequence

<220>
 <223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 137
 tgcagcttca gcttctgtg 19

<210> 138
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> artificial Sequence

<220>
 <223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 138
 accgtcgtac tggtaaatcc 20

<210> 139
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> artificial Sequence

<220>
 <223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 139
 tggcggcatc tccagatttg 20

<210> 140
 <211> 20

<212> DNA
 <213> artificial Sequence

 <220>
 <223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

 <400> 140
 gtcgtgggtt cccaggttac 20

 <210> 141
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> artificial Sequence

 <220>
 <223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

 <400> 141
 gatccattcc tgccctctac 20

 <210> 142
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> artificial Sequence

 <220>
 <223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

 <400> 142
 ctggtcgtac caccggtat 19

 <210> 143
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> artificial Sequence

 <220>
 <223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

 <400> 143
 gcagagcgta accttcgtag 20

 <210> 144
 <211> 228
 <212> DNA
 <213> artificial Sequence

 <220>
 <223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

 <400> 144
 ggctgatagc acttaaggag cttcctaatac acgaaagaat tctgcaggat ttagttatgg 60
 acatactgag agtactctct gtcctgact tagaagtccg caagaagact ttaagtctag 120
 cccttgaatt agtctcttca cggaacatag aagaaatggt attagtatta acaaaggaag 180
 tgagtaaaac ggtagacagt gaacatgagg atacaggaaa gtacaggc 228

<210> 145
 <211> 279
 <212> DNA
 <213> artificial Sequence

<220>
 <223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 145
 tacctgtggc tctcacaggc agcgaagatg gtaccgtag agtttgcat acgaatacac 60
 acagattaga gaattgtttg aattatgggt tcgagagagt gtggaccatt tgttgcttga 120
 agggttcgaa taatgtttct ctggggtatg acgagggcag tatattagt aaagttggaa 180
 gagaagaacc ggcagttagt atggatgcc a gtggcggtaa aataatttgg gcaaggcact 240
 cggattacaa caagctaatt tgaaggcgct gccagaagg 279

<210> 146
 <211> 501
 <212> RNA
 <213> *Diabrotica virgifera*

<400> 146
 gggacaaugu cacaauuaau gauaaaucca caauuuccuu uuacaacaga aggacgugga 60
 aguuuguacc agaaagauc gugggagauc uuacugauca aaucacgacu uucaauccua 120
 uuguggcauc gauagccagc uuaguuaagg aaaaaacua cauaguacuu auaggaguag 180
 acuuuuucuu ggaagaauac aagaucuuu ugacuguuac caagacugua gaagaauuca 240
 cuuuugaggg uuacgacgau ccuuugcuua agcuagucca aaaaauaaau auaaccgguu 300
 ugaagauacc cuuuaaaaaa uuuggguggu uuguagacag aaacgacuca gcuccauacg 360
 auggaaugug gaacauggac aauggagcua auucaauuga uacucuaggc cuaguuaagaa 420
 auuggaaaua ugaauucug uugccuuuu augaaggagc guguggagaa guggaaggua 480
 cucaagggga acuaugguau c 501

<210> 147
 <211> 502
 <212> RNA
 <213> *Diabrotica virgifera*

<400> 147
 gccaacuaaa agauaaauaa acggcuugcc uggaugauau acgaacagaa caaauaaaga 60
 acuuuggacc gaaaccguua aguggcuccu aaaaauaug aauugcugua uccguacauu 120
 acauaucccc aaaaccugga ggaaagcuua agugguagca cuauuaaaac cagggaagug 180
 uccggcagau acaaagaguu uuagaccugu cucucuucug ugugaccuuu ucaaagugug 240
 acacugaacu ugaccgccga aucuauggag acuaaaaua uuccagaaca agcaagaau 300

aauaaaucan uaaacccuua aucucaucca acanauugau uuugguuuuu aacggaaaaa 360
 auaacaggug uaacguuagu agaccuaacu gucgccuau acacaguuaa ccaucaacgg 420
 cugcagcaaa acucucagaa ucuacaaaga auuuccgacu uacaagguua guggaauguc 480
 gccuacagaa uggacguaaa gc 502

<210> 148
 <211> 500
 <212> RNA
 <213> *Diabrotica virgifera*

<400> 148
 ggcauuuuuu gauaaagaag aaugggugca auuuuagguu aaaaauaaca aaaguacag 60
 aagcuauuuu gaagaacaaa cacgauucag auuuuuucaa gaaaaucuga gaaaaaucga 120
 aaucacaaau gaaaaauuaa acaauaggaga gucuacuuuu aaguuuuggug uuaccaaauu 180
 ugcagaccua acugaaaaag auuuucugga ccuguuggug cuaucuaaaa augcaaggcc 240
 uauuagaacu caugcuacac auuugcuagc cccacuaaga gaucuaaccau cagcauuaga 300
 uuggagagac aaggagagcug uacugaggu aaaagaucua ggaugugug gcucuuguug 360
 gaccuuuagu acaacugggu caguagaagg agcucauuuu cuuaaaacug gaaucuggu 420
 auccuuuagu gaacaaaauc uaguagauug cgcaaaagac acuugcuauug gguguggagg 480
 uggcuggaug gacaaagcuc 500

<210> 149
 <211> 501
 <212> RNA
 <213> *Diabrotica virgifera*

<400> 149
 gacacgacga cacagaauuc ucuacacaaa guauccuuaa cgucaggag aaauucguua 60
 agaccgucaa caaaauugau gaaaccauuu uagugccuug ucguuugaug gaccugaaag 120
 ucggagauga gcaagaccca gcuugucuaa auucaaaaaac caaaucuauc cacucuguc 180
 accaaaauuc aaguucuaa gaccuguuug agaucuaaca uauuugaau gggguuaagg 240
 acucgcuguu auggggagga gcuaagagc cuccaaagaa uccuccacca ccuacuaccg 300
 caauuguaac aucaguaacu acuccaaucg ucaagggcc cauccggcg cccucuucag 360
 ugagugugac uuccacaaau ucgucaucua cucucagcga uacugauuc gagucuggca 420
 gcaaugaaau cgauucugga aucgaugaa cgucccaaga ggaaggaaaa gccgaaagaa 480
 ucgcucaaga uuuaaaaaga c 501

<210> 150
 <211> 502

<212> RNA
<213> *Diabrotica virgifera*

<400> 150
gaccugagug aaagccaaag agaggacaaa ccagagggac ccacuuugca aguuaugccu 60
agugagcaag ucagaaaauca acuuauuaac augucuacug uauugaaauca agccauacaa 120
gucuuuauc cuaauaagaa gaagcuugaa cgcgaaaaac uuagagcugu uaugguucag 180
aauuaucacg aaacaaaggu uagagaacac cagaaaauuu uacaaaggca caagauuuuu 240
gaggacagaa aggaauauau ugagcguuug aaucacaguc ggaagaaga ggagcagaaa 300
agauuggaag aaugcaacg gcagcacuua cuggccgaac aaaaacgauu ggaccaagaa 360
agagaagaaa gagagcggaa acgugcucua aaugaaaucc agcagguuua agacagacac 420
uuaaaggaaa aacuacaaca aaucagacag acuggucaug gucagaagau ucugaagaaa 480
auggaugaag acgauaucaa ac 502

<210> 151
<211> 501
<212> RNA
<213> *Diabrotica virgifera*

<400> 151
ggagcaccca auaauauaaa uucuucugga agaagacauc agcuguaugu uggaaaucug 60
acuuggugga caacugauca agauauagaa aaugcagugc augauauagg gguaaccgac 120
uuccaugaag uuaaguuuuu ugaacacaga gcaaaugguc aauccaaggg auucuguguc 180
auaucuuugg gaucugaggg aagcaugaga cucugccugg aacuccuauc uaaaaaagag 240
aucaauggcc aaaauccccu uguuacccuu cccacaaaac aagcucuauag uaacuuugaa 300
agucagucua aaacacgccc uucuccuacu aauaaauucua acucacgucc ucccacuccu 360
aauaauaauug uucauucagg uccuauagcag aauuauggag guagaaugcc uaugaaccuu 420
uccaugcguc ccaugccccc agguaugcaa ggugcuccaa gaaugcaggg uccaccugga 480
uuuaauggac caccaaau c 501

<210> 152
<211> 502
<212> RNA
<213> *Diabrotica virgifera*

<400> 152
ggguggccca ccuccagacc accgcgcuga gauuccucag uuaacagagc aagaguuuuga 60
ggauauaauug ucccggaaau gaacaguuuc caguucggcg auugggcggg ccguauccga 120
cgccgcagcu ggagaauuug caagcgccau ugagacuuug guuacugcua uuucacucau 180
caaacaaucc aaaguggcua acgacgaucg uugcaagauc cuuauaaguu cgcugcaaga 240

uacuuugcgu ggugucgaag acaaaagcua cagcuccagc cgagagagacc ggucaagauc 300
cagggacaga ucacauagaa gaacuagaag agaacgaucc ucgucacggu acagagacag 360
aagcagagag agggagcgug aacgcgauag agaucgugau cgugaacgug acagauauua 420
ugauagauac agcgaaagag aaagagaccg agaucguuca agaagcagag aaagaacaga 480
aagggauaga gaacgagauu ac 502

<210> 153
<211> 504
<212> RNA
<213> *Diabrotica virgifera*

<400> 153
ggaauggacc uagaccuaau gguccugggc ccaauauggg aaugagacc accggggccac 60
cucauggaca acaagggccc ccaagaccac caaugcagg accaccgcag caagguccuc 120
caagaggaau gccgccacaa gguccaccgc agaucgucc agaauaggaau cgaccaccaa 180
ugcaacaagg guaccucaa ggcccgcgc auaugcaagg accuaacaug gguccaagag 240
guccaccca aaugggacca cccggggcgc cucaacagca aggaccagcu ccgcacguua 300
auccagcauu cuuuaacaa ggaggaggac caccgcccc aaugcaacac augccuggac 360
cagggcccgu caugccuccu caaggacccc cgcaaggucc accacacgga ccuguuggac 420
cuccacacgg ccaccauug gguccagcga auguuccgcc ucauggacca ccucacggau 480
augguccacc ugcagcgaug ccac 504

<210> 154
<211> 501
<212> RNA
<213> *Diabrotica virgifera*

<400> 154
guaauggagu uagagucaaa auugaacgaa gccgaaaaag aaucacauaga gggcgucucc 60
acgcgaaaca aacguacccc uucggaaugg auaccgcggc cgccugaaaa guucugucuc 120
acaggucauc gagcgccugu gacucgagua aucuuuauuc cagucuucag ucucaugguu 180
ucggcaagug aagacgccac caucaaagug ugggacuucg agacugguga auucgaacgc 240
acccuuaaag gucacacgga uugcguccag gauauagcuu uugaugcauc ggguaaaaua 300
cugguauccu guagugccga caugagcauc aaacuauggg auuuccaaca gacguuugag 360
ugcgugcgca cuauguuagg ucacgaucac aacguuucga gcguuucguu caugccagcu 420
ggcgauuucg ucauuucguc uaguagggau aagaccauca aaauugggga gguaucgacg 480
ggguauugcg ugaaaacaua c 501

<210> 155

<211> 502
<212> RNA
<213> *Diabrotica virgifera*

<400> 155
gcggaauuga ugauagcuua aggcaauug auguagaagg aaacacguac aaagcucaaa 60
gucugaaacu cgguucucua ccgagaggua uggauauacu uaaauccgaa aacguuauua 120
uaacugccag uguaaaugaa auuacgguag ccaaagauac caaaaacu agcacuuuaa 180
aagugaauua cgaaccuucc agcguuaguu guuccucgaa uggucacauu gcuaauaggag 240
gaacuguaga uaauaaagua cacguguuca aacucgaaaa uaauaaauug gaaccaguua 300
cagaguugac ccaucucggu ccuguaaugg acguugccua uucaccggac gacaaguauu 360
uaguagcuug ugauggucau aggaagguag uacuguauga gacagaagaa uauaagcuug 420
ccaauaacca ggagugggga uuccacaaug ccagagugaa cuguguugcc uggucaccag 480
acucacuauu gguggcuagu gc 502

<210> 156
<211> 501
<212> RNA
<213> *Diabrotica virgifera*

<400> 156
gguacgaug gaaaauaaaa guguaguucu uucuucguuu uucuggggcu acauuuguuu 60
gcaaauauuu gcuggacaac uuggucaaac uuaugguacu aaugguugg cuuucguuuc 120
aauggccguc aaaucaacag cuuguuucuu uaucccauuc auggcugaau ggcugggauc 180
uucuggaguu auagcauguc gugugguaca aggaauauca caggguuucu uuuucccuuc 240
ggugcauaau auuuugggaa aaugggcccc auuggaagag agagcguuuc uuucgaugau 300
agcuuuugca ggaccaucau ucgguacaau ugugucacua auugcuagcg gagcaauagc 360
aucuucuugg gcaggguggc cguaugcauu cuacauauuu ggagggcugg guuauguuug 420
gaugcuaccg ugggcauucc uugcagcgaa uacccugcc uuacauccga auauauccaa 480
agcagaaaaa gauuauauag c 501

<210> 157
<211> 502
<212> RNA
<213> *Diabrotica virgifera*

<400> 157
guuaaaagug cauccacuuc ccuaaacuca aaaguuguuu cccaacacuc aagcuuuuug 60
gguccacuug cugucgaugc aguucuuaaa auuguugaac cugguagaga acaagcuugu 120
aauuuauucug auaucaaagu uauuaagcaa cuuggaggua caguagaaga uaccgaauua 180
guagaaggaa uuuguuucc ucaaagaucu gcaaauugcu cuggaccaa aaggauugag 240

aaagcuaaaa uugguuucan ccaguucugu auuucaccuc caaaaacaga uauggaccac	300
aaugucanug uuucugauua cgcugcuaug gauagaguau uaaaagaaga gagagcauau	360
auuuugaaua uugucaagca gauaaagaaa gcuggaugua auguacuuuu gguucaaaaa	420
ucaauuuuga gggaugcagu uucagauuu gccuacacu uuuuggauaa aaucagugu	480
augguuauua aggaauuuga ac	502

<210> 158
 <211> 502
 <212> RNA
 <213> *Diabrotica virgifera*

<400> 158 gcgaiaaaaa ugauaiaaaa acggacaagu uuauuaauuu aagagacgga aaagagagcu	60
ugaaaaggaa aaagacuuua ucaguguauu cgcuuuccuaa uuacgaugaa uugaaguuga	120
cuguuuccga auuuaaagau gauaauaaag ggccauccuc ucuaaagacg gacaaaaaag	180
gucauccuuc agaaauaucu cuaccaguag accacaaaaa gacugcaaca ggcucuacgg	240
gaaaguugga uacguacaua acaagaucc gaaguuuugg auccauuuuc ccacagcaac	300
ugaagaaauu acguccgcga aaagcaccaa cagauauuga aagcgaugau uccuuuggug	360
guuuagaaga cugggacuua ggacuaauug aacauuaaua uccaaaagau gcuaguuuac	420
caagaccaag gaaaccagu uuaaauaug auuccguauu agcaggccua gaaggcauga	480
ucguaacaga agaagaaaua gc	502

<210> 159
 <211> 502
 <212> RNA
 <213> *Diabrotica virgifera*

<400> 159 ggauuuucua ugucuguugu cauagcuau cuuauaaaua ucuauggcag aaagacauua	60
uguacuaugu cgaguauugg uauggcccuu accaugucag uaguugcgau auacguaaaa	120
uauuaugaaa uauaccaga caaagaaaag uuguuagcua cuugccacua auugguguca	180
uguugaacgu ggcauucagu augguuggca ugcuucccgu uccauggguc augguaggag	240
aaauguuccc cuugaaaguc agaccacuaa ugucugggau aguaguaagc uuggcgcaac	300
uauugauauu uauuugugca aagauuuua uaaauaugaa cgacgcuuua aacuuuagcg	360
gaacuuuaau aguauuugua guagcuuca uuuuagcugc cguuuacua aagacgauac	420
uaacagaaac uaaaaacaag acgcuggaag aaucgaagc ucauuuuagg ggaaacaaaa	480
aaguauguac aguugaugau ac	502

<210> 160
<211> 501
<212> RNA
<213> *Diabrotica virgifera*

<400> 160
gcagcuaugu ggaugaaacu ccagauaagg agacuaaagu gaaacuuaua gacacauuaa 60
ggcaaguuaac agaagguaaa auuuacguag aaguugaaag ggcucgucug acucacaaaau 120
uagcuaaaau ccgugaagau gauggugaca uacaacaagc ugcugacauu auucaagaac 180
ugcaggugga aacauaugga ucuauggaga aaagagagaa aguggaauua auacuagagc 240
agaugagguu guguguugcc aagcaggacu acauuagaac ucagaucuuu uccaagaaga 300
ucaauacuaa auucuucgau gaagauggcu cuucagauuu aaaaauaaag uauuacagac 360
ugaugaugga gguggaugaa caugagggcu cauauuuggc aacuuguaaa cauauauggg 420
cuguucuuua uacccaagc auuauggcag acgccgaaga aagacaagcu gcagcgcaag 480
ccguuguucu uuacauuaua c 501

<210> 161
<211> 501
<212> RNA
<213> *Diabrotica virgifera*

<400> 161
ggaauuaau uaugaaauac gauuaaaguu uuggaaguuu gaugaaucua aacaacaauu 60
ucaccuaaaau accuccaucg aaauaccgca ugaagauagc auuaauagua ugcuguuua 120
accguguagu aaagaugaaa gacuucagug cguaaccguu ggagacgaca aaaaauuuua 180
aaauuggcaa uuguccgaaa uugaaguagu cacagguacu caacuauccu ggcagugcuu 240
uggaguuggc uuuuaucgaa auuugccuug caaugcuua ucauuuuaa uagauggguc 300
ucuaauugca acaggauucg gagaaauacu gacaguugg acuuucugaua cauguuugcu 360
uaaauguucu cuacuccauc cucuucuaa gaaacaauua aaguacauac aguunggcu 420
cgguaaccaa ugccaucuc uuguagcggc uaguaaaaau caacuuagcg uuuggaauau 480
ccuaacguua ucuaugacau c 501

<210> 162
<211> 501
<212> RNA
<213> *Diabrotica virgifera*

<400> 162
ggaagucguu gaaauuaaaa aacgacguca caggaggucg gugcaacaga ugauccgau 60
ggaggaaaaa agaaaaaagc uuuuagaau acaucccuua caagucaaa uaguggcaaa 120
guuaaaggau gguccuuugc ugacuaucua guuuuccuac cuaauaaaau uaaaaucau 180

uacagucaug uccagcacga acugcucagc auguaaaaua acuggcaacu cagcuaggga	240
aguguaaacc ggagagaacc uucugaguga guugguagaa gaugauaau gcuagaaag	300
uccaaaacca auaacgaaau uucagauuaa gaagaucgga cuuacuucuu uucaaucguu	360
agugccacag aucggauacg cauaccuug ggcucuaaga guaugcggaa gagauuuucu	420
uaauaaaaaa auggauucgg augaauuagg cagaacuaau guagaaaua uaaugaaaau	480
aaauuuuaaa agauuggaau c	501

<210> 163
 <211> 502
 <212> RNA
 <213> Diabrotica virgifera

<400> 163	
gaucaaugga cgaugaagga aaauugaaaa aagaaucaaa ugcuaagaaua guaagauggu	60
cugauggguc uuacagucua cauuuaggcu cugaaauucu ugacguauau aaacaaccu	120
uacagggaga ccacaaccac uuguuuauuc gucaagguac agguuuacaa ggucaagcag	180
uauuccgaac aaaguugagc uuugggccgc acucaacuga aaguuuacac cacagaaaga	240
ugacucuuuc uuuggcugac agaucuacca aaacaagugg uauuaaauc augucgcaag	300
uuggugugga uccugauuaa gacaaagcaa caagaauaaa gaaagaagaa gaaaaacuua	360
ggcaaucggc auccaaacca aaaacuacua gaaagaaguc cgacaaagcc ucuagggcac	420
uugaaaauac uuuguuagg gaggaagaag guagugauga cgacggagca auuucucuug	480
cugcaauuaa aaguaauau ac	502

<210> 164
 <211> 502
 <212> RNA
 <213> Diabrotica virgifera

<400> 164	
gcgaucaacu uauaaaacua aacaaccaa cugcaggcag agauaaaaau gccaggcugc	60
ugcaguacuu gaguagguuu guauggcaca auuugcagaa aacucaaaaa caugguguag	120
uaagucugaa aaauuuggaa uuucaguuga guacuucac gaaauuacuc agauuuggaa	180
gauuugccga aaguauauau acaacauuac cauucucga gcaggaua ggcacuauc	240
gcuaucugu gauuuuaagc aaaauugcca auucguuguu ucuuuuggcu gaccacauac	300
uauuguuagg acgugcagac guguguacag uggacacgga gagaugguca cgucuaacca	360
acaaguauug guuauauucc auaacuauga auuuaguag agauuucua gaaauuucua	420
auauuuuaaa aaguaauaag gacucaauuu uacaaaaua auucaguuca aaggaaaugc	480
uacauuuuu guuacgaagc uc	502

<210> 165
 <211> 374
 <212> RNA
 <213> *Diabrotica virgifera*

<400> 165
 gaugggcgag gaggaauca caccaauaa uaucaaagaa aaucagagug agaauaugaa 60
 ugggaauuaa aauggucaag aggaaaaucc accuccagaa gaaauggaua caaaugggga 120
 aaaugaugua aaugaagaug aucuggauga agacaaugau gacaugucgc cugaagaguu 180
 ugcugcacuu gaucaccagu uagaugccuu aaauucugcu uuagaugaca uagaacagaa 240
 aaaugauaa auacauucgc aguuacuaga acucuccau gcuaacaggg aaauccggac 300
 ucaauuacag caagauaaag cuagcacaga uaacagagaa gacguaaaau aaacaaauga 360
 accaaaagca ugac 374

<210> 166
 <211> 500
 <212> RNA
 <213> *Diabrotica virgifera*

<400> 166
 gcagguuauu aguacauuaa cgaaaguucu uaaauguaau cagagaagcu caacagaguu 60
 uguuacgaac aucgaccggg aagguagagc caucgugaaa uguucaucuu uucagcacug 120
 cugcgauuu aaacaagaua ucgagaaguu uacgucccga cacggcaaca aaccuuugaa 180
 gguacuuguu aaccaugcuc aucuuauauc ucaucagaua uuugcaggaa agauauuaaa 240
 uuggcuagaa aaggucuuua uacaaggaga aggauucaga gcuaauuuug ccgauguugu 300
 gcugaagcca cagaauccag agccgugcau aaauaagggc auccuacaaa aagaauuagg 360
 ccuuuggaag agcgcuagga gccaauggca ucgcuuguua auaucaggca ugaugcucga 420
 guaугagaac aagaaagcuu uagcuaaaau auuuacaaa aacuaugggc aaguaaugaa 480
 agacuuuauc aaagaugauc 500

<210> 167
 <211> 502
 <212> RNA
 <213> *Diabrotica virgifera*

<400> 167
 gugaaauauu acuugcuagu guucuguaua gcaacuacac uuacauuauc uacggcacia 60
 uccuaugaag acaagagaug uaaguguaua ugccccagua uauccucagu aguaacgaau 120
 aagacggaau cuaagaacca cacaucuagg auuuuauaca uuaccaaugu accaccaaau 180
 aaugcaauu gugaugaagu uauacuaccu aggauuaguc aagaauuuau aggaaaagaa 240
 caagaauuuu guccaagaug ugaauugcaa uaugaaaaua gaaacacuac uauaauuaaa 300

guagugguga uuauaguaau uuggguuauu ucgauuuugg ucauauacau ggcauucuuug 360
 aucauacugg acccgugcu gaacaagagg auuaaaggaa acuaccaaga gcauacaaau 420
 gaagaggauug acguaucugc ugguccaauug ucccacaaca ugagcguaag aggaaacguc 480
 uugaacagag uuggacauca ac 502

<210> 168
 <211> 501
 <212> RNA
 <213> *Diabrotica virgifera*

<400> 168
 ggcuguuaau ucauuuuuaa ggcauguugc ggaauuacua aaguaugaau cagaugaaca 60
 auuagaagaa uuguaucaga agacugcuug guauuucgaa gaaaaguaua agaagaauaa 120
 agcuagugca uaugacuucu ucaaacaggc uguuuuagac cccaguauuu uagcagaauug 180
 ugaauuagau gacaaaacaa aagaagucuu gcuuaguaac auuaagagaa agcuacauc 240
 ucaagcaguc aaaaucagag cugauauuga augugcuugu uaugguuauug aagguaucga 300
 ugcuguuaaa acugcucuua aagcuggcuu ggcucuuuca acagaagaau uacccauuaa 360
 aaauaaucuu auagcuccuc cucucuauugu uaugacuaca ucuacaccug aaaaacaaga 420
 ugguuuaaaa guuuuaggag augcuauaga aaaagucaaa gcgacaauc cggauuuggg 480
 uggaguauuu aaauuucaaa c 501

<210> 169
 <211> 500
 <212> RNA
 <213> *Diabrotica virgifera*

<400> 169
 guauaagaag aaauaagcua gugcauuga cuucuucaaa caggcuguuu uagaccccag 60
 uauuuuagca gaauugaa uagaugacaa aacaaaagaa gucuugcuua guaacaauaa 120
 gagaaagcua acaucucaag cagucaaaau cagagcugau auugaauug cuuguuauug 180
 uuaugaaggu aucgaugcug uuaaaacugc ucuuaaagcu ggcuuugcuc uuucaacaga 240
 agaauuaccc auuaaaauaa aucuuauagc uccuccucuc uauuuuaua cuacaucua 300
 accugaaaaa caagaugguu uaaaaguuuu aggagaugcu auagaaaaag ucaaagcgac 360
 aaucacggaa uuggguggag uauuuauau ucaaauggcu cccaaagugg ucacagcuac 420
 cgacgaagcc gaacucguca aacagaugga acgagcugaa cucgaaaacg cagaaguugc 480
 uggcgacgac gacgaagaac 500

<210> 170
 <211> 502

<212> RNA
<213> *Diabrotica virgifera*

<400> 170
gcguaauauc uaacaauuaa ggaagugugu ccuccacauc uauagaucac aaucagguu 60
uagcuaguau gguuccugga guacaaacac cggguaugcu aacaccaca ggcgacaugg 120
aucugcgcaa aaucggccaa gcaagaaaca cucugaugaa uguuaaacug ucacaaguau 180
cugacucugu aaccggucua acaguuguug auccuaaggg guaucuuacu gauuuacaau 240
cuaugauacc cacuuauuga ggugacauua augacaucaa gaaagcuaga cuacuauuaa 300
aaucagucag agaaacuaau ccaaaucac caccugcuug gauugccagu gcuaggcuag 360
aggagguuac aggcaaaguc caagcagcua gaaaccuuau aaugaaaggc ugugaaguua 420
aucccaaaag cgaggaccua uggcuugaag cggcuagacu aaauccaccu gauaccgcua 480
aagcaaucau ugcucaagca gc 502

<210> 171
<211> 496
<212> RNA
<213> *Diabrotica virgifera*

<400> 171
gacagcaaaa auuaauuuuc agguaaaaaa uaaagauauu cugcaaagug guauauuuuaa 60
ucaaacuuaa agggacuggc agaguaucca augugaaauc acagcgaaaa auuugaugua 120
cccagucuuu auuguggaag augaugaugu cguacaaccc auuaguagua ugccuggaau 180
uucaagguau ggaguaaaua aaauacguga ucauuuacaa gauguuguua aaaauggacu 240
acaauucugug uuacuuuuug gagugguaga aaaguugucc aaggauuuu uugcuaccca 300
cgagauagc ucacaaaau caguagucag ggcacuuccu aaacuaaaaa aaugguuucc 360
uaucugaca auagccugug auguuuguuu augcccuac aguuccaug gacauugugg 420
aaucugaac aaugauggua guuuaaaaua uacugcuagu auccaaagaa uaucagaugu 480
agcucuagcu uaugcc 496

<210> 172
<211> 502
<212> RNA
<213> *Diabrotica virgifera*

<400> 172
gggguguuau uuaucaaaa acccgauug guauaucugga gaagacuua ccauucugga 60
ucaggucaau acgaauuaa aguguauggu acuuacaau augugucagc cgaagauuuu 120
uugaauguuc aaguugauu ugacuauagg aggaaguggg auacgagugc aguuauccuu 180
gaacacgcag agucugauc uuugaagaau ucuaacagcg augucauuu cugggaacuu 240

uuauggccua ggcuguuugu gaaucgagau uacgucuuua acagacguua cuugauagac 300
aacacauuga acacuauauu cauccuaaac cggagcaccg aacaucacaa guuuccaaaa 360
uacgcagaaa aaauucggau agacgacua uggucgugua ugguaaucaa accguaugaa 420
ggagacauga cgaggccagg aaucacaguuc gucuugaccu acucagacaa cccaggcgug 480
aguauaccac ccucgguaac ac 502

<210> 173
<211> 496
<212> RNA
<213> *Diabrotica virgifera*

<400> 173
gugguacagc aaucacaaugu aaacgaauau uuacuaaaaa aacaacaaga aaguccuaaa 60
gaauuaggcu cagaauaggc cgaacuugaa gaacuucua aaaaaaaaauu guggcaucag 120
uugacucuaa aaugcugaa uuuuauuaag aaaccagaac uacagaagaa ugauaaccuc 180
auacaacugu acauaaacuu uauucacaaugu uuugaaaaua aaaucaaucc uuugucuuug 240
guugaaauug uugcuauagu aguccaaca uucaaaaauc caaaagaugc ugucgcuuuu 300
cuugaaaaga cugaaccuaa gguuaaaaau aaucacagau cccaaacuu gugcaaguu 360
uuagcugggc agauauauau cgaaaaguug aacgaauuag augcuacua aaagauauu 420
gaagaagugg aaucacauu ggacaaugcu gauggugua caccaguuca uggaagauuu 480
uuuuuacuug ccucac 496

<210> 174
<211> 502
<212> RNA
<213> *Diabrotica virgifera*

<400> 174
guaguagcaa ucuaaacac aggcuuuguu aaaaucuaac cagaucacaa ucauuuugga 60
guacaauuga uagaugaagg ugcagauua uucgaugcca aaaucaaccu cgaaguccag 120
ugguguaagg aacauauau agcagcauc gagagaaaag gugguguuau cacuuccgcu 180
uacuacgauc cucacaguc gcaggcuug guuaacagca agaaguuuuu ugaaagaggu 240
auuccaauac cccgcagaau gaugccuccc ccagacgcca uagaacacua cucagaucuu 300
gcacagaggg gauuuuaggc agaucccgag aagaauuccc aagagcgucu aguccuagcc 360
cagaaauaug guuacagguu accaaaaaua gaagaagau cugcauacga gauguaauug 420
gaaaggaaag auccuaggca gauauucua ggucuauc cgggaugggu gguaauuuug 480
acggauaaga cuuacuuua ac 502

<210> 175

<211> 502
<212> RNA
<213> *Diabrotica virgifera*

<400> 175
gaagugggua aacuaaaaau uagcaaaccu guuggacaaa aggcucaagu uucgcuuaca 60
uuauucuucag caauucuuaa uuugaaugag ccuggacaag aaaguauucc aaaggaucau 120
agauuagaug uauccacagu uacucaacaa acuuugggug ucuuuucaca uguuacacca 180
acuaauauug auucuguggu accugaaacu gaaaagcugc acauggaagg caaaauagug 240
caaaaauugg aaugcaggcc auaugcagau aauguuaca ugaaguugaa auuagaauuc 300
auuaggaaag cuucucuacc aguucgcaa gugaagcagu uagacagggu uguacaaaca 360
uacaagccag uaucugauca uaaaauaau auugaguaca uggagagaaa gaaagcugaa 420
gguaaaaagg cucgugauga caaagaagcu guuuuggaca uguuguuugc agcuuucgaa 480
aagcaccaau auuauaacau ac 502

<210> 176
<211> 501
<212> RNA
<213> *Diabrotica virgifera*

<400> 176
guaacaauca aagcucaaga ugaugccgac auaguaacgu uuauguuuga agccaaaaag 60
caggacaaga ucucagauua cgaaaugaaa cugaugaauu uggaccagga gcauuugggu 120
aucccgaaaa cagauuucuc uugugucauc aggaugccug cagcugaauu cgcaagaaua 180
gucaaagauc uuucacagu uggagaauuc aucguaauc caugcacaaa agaggguguu 240
agguucucua cuucuggaga uauuggcagu gcuaacauca aaauugccca gacaaguaau 300
uucgaaaagg aagaggauc uguaaagcau gaaaugcaag aaccaguua ucuuacuuc 360
gcuugucagu auuugaauuc cuucacaaaa gccacaccuc uuacuaacgu ugugcagcua 420
ucgaugucug acaauguacc uuuguagu ugaaucaaaa uaccugauuu gggccauuug 480
agguacuacu uagaccuaa c 501

<210> 177
<211> 502
<212> RNA
<213> *Diabrotica virgifera*

<400> 177
gaguaaugau gacacaguaa caaucaaagc ucaaugau gccgacauag uaacguuuau 60
guuugaagcc aaaaagcagg acaagaucuc agauuacgaa augaaacuga ugaauuugga 120
ccaggagcau uuggguaucc cagaaacaga uuucucuugu gucaucagga ugccugcagc 180
ugaauucgca agaauaguca aagaucuuuc acaguuugga gaaucaucg uauucucaug 240

cacaaaagag gguguuaggu ucucaacuuc uggagauauu ggcagugcua acaucaaaaau 300
 ugcccagaca aguaauuucg aaaaggaaga ggaauucgua agcauagaaa ugcaagaacc 360
 aguuacucuu acuuucgcuu gucaguauuu gaauuccuuc accaaaagcca caccucuuac 420
 uaacguugug cagcuauca ugcugacaa uguaccuuua guaguugaau aucaauuacc 480
 ugauuugggc cauugaggu ac 502

<210> 178
 <211> 501
 <212> RNA
 <213> *Diabrotica virgifera*

<400> 178
 gaggaaucca gcucgaacag cgacagcucu gauaaauucag uaaaauugcu ggaaaagcuc 60
 acaaaagaaa gaauuagacu uggagaagaa aggaagaagc aaaaagaacu aaucaaagcu 120
 acugaaacag cagaggagaa gagaauagg cggcucguua agaaggagaa caaagagaga 180
 uccaggaaag agagaauagg cugggauaac gaguauuuac auuauacaaa cagugacaau 240
 ccuuucgggg auggaaacuu guugucuaca uuuguguggu ccaagaaguu aaacaaagaa 300
 ggauugaaag guguuaguca agaagaauc gaagcaauaa acaggauaa acaagaagaa 360
 aacaaaagag aacuggaaaa aguaaaaaag agacgucuag aaagagaauu agaaagacag 420
 aagagggacg aagaaacca gaugcuccaa agaagcaagg aagcagcaca auuugaagag 480
 ugggagaggc aagaagauaa c 501

<210> 179
 <211> 501
 <212> RNA
 <213> *Diabrotica virgifera*

<400> 179
 gaacagucug gaagaaauau uuuggacuac cagaaucagg cgaaaauuu auuucgaaaa 60
 uuggggcacc agucccucg uagauguuca auugaaacgg gaccuuauau auuccauuau 120
 uuaauagaau acgaaguug uuaccuagua uuaugugaaa aggcuuucuc aaaacgacug 180
 gcuuacucau auuuggaaga uauagcacia gaauuccacg cacaauagg caaaagagug 240
 aaucaguaa cuaggccua uacauucau gaguugaca cauauacca gaaagccaaa 300
 aaacaguug cagauucgag aucgagaagg aauuuaaaug ugauaaaaua ucagcuacac 360
 gauguccaaa ggauuaggu acaaaauua gaugaugugc ugcagcgagg aacuguucua 420
 ucagaguugg acacaaaac gcagaauca uccauguuaa cggacaaaau caagaaggau 480
 ucgacauacu ugaacacaaa c 501

<210> 180
<211> 482
<212> RNA
<213> *Diabrotica virgifera*

<400> 180
gauggaugcu gaaacuggag aauiuuuaccu agaccuugaa acuggagaaa uauccgaagc 60
ccccgcaguc caaaaugucg aaacggggga guacgaauau accagaacuu uuaaaauccc 120
aagcuacuac uacagaagau accaagaaag aaaagaaaaa accaacugca cuccacguaa 180
agcagaucuu cuggagucac aguugauuac cgcggcuauu uuucuaucac cgacaugau 240
auucuuuccau ccuauaucg ucguuuuuugu uugcgugaua gaaaauuuuu uacauaucg 300
cauucacaga aagaacaaag aacuagaaga ucuguccuuu uauuaccaga gcccauuaca 360
uggccuuaca aaagagguau gugcuagaug uaaagacgaa aaagccaaga auaagaucgc 420
gaagcugcaa gacaagcagc augagaaaau caagaauuac aucaaaaggg uuguuacuua 480
ac 482

<210> 181
<211> 501
<212> RNA
<213> *Diabrotica virgifera*

<400> 181
ggugaauua augacucuga uauugaaugg gaacuguguu uuccccaagc acaaagauau 60
cuggaaaguu ucaugaguca ugcucaaaug aaaagcuuga ucauucuuu aacacuucuu 120
aaaacuuiu uagaaccuca gacugcgcau uuaggucuca cggccgauca uuaagaaac 180
uucaucuuuu uggaauugua gucccauuau agugacuggg cagaacauag gcuagguuu 240
aaaauuguuga aaguacuaa acgucuucau acacaucua cacaagcuu accauguuu 300
ccagacuuuu uuguuaccaa uaaaauacu uuaagugaag uaccuauuag aaaaauagaa 360
gagcucuaau ggcuuuggau gaaauiuuuac aaucucccu gauguacuuc auaaaagccu 420
uacgaaaucu uagauuaca gacgggagaa auuucuuucc uccuuuuuuu uuuuacagu 480
ugcacgaucu gcuaauuuuu c 501

<210> 182
<211> 502
<212> RNA
<213> *Diabrotica virgifera*

<400> 182
gccaaaauu uuaagauaa cgacgcaaaa uguguacuug gcuauiuuu aacuagacac 60
aagaaagau auuccaguuu aucgucuuu uuuuuuccu uuaaauiuu accgagugca 120
gaugacauaa auguuggagc agaacuuaa ggaacuuga aaaaacaga uuuguuuuu 180

guuuugaaua aguuuuauca gaaaaaagaa auuaaggcau ugcuauguaga uaauggauua	240
gaucaguacc uucagcacca agccuaugug aguuuuccgaa gauauugccu agaagcacia	300
aauiuuaccag cagauaucca cguagucuuc agugacauuc uacagggagc uggaauauuc	360
acugauauuu ucccuacu ucuacgacau gccaaaauga uguuucccca ucucgacugc	420
auggaugauc uuagaaaaau uucugauuuu agaucaccug cuaacuggua uccugaagca	480
agggcuauua acagaaaaua ac	502

<210> 183
 <211> 501
 <212> RNA
 <213> Diabrotica virgifera

<400> 183	
ggagaacauu uaacucuaaa aauiaggucg aaaacauuug aagcaauguu aagacaggaa	60
auuggcuggu augacaaaa aagcaugga guuggggcac ugugugcacg ucuggcugga	120
gaugcuguag cuguccaagg ggcagcuggg ccacagauag gaacaacaau aaacuuuauu	180
ucaacauuca uacuucugug uacguucugc uuuuauuuug aguggaggac aagcuuugug	240
cuuuuuucuu ugugucccg uauauucuuu ucuguauauu uugagcagaa gguauuacaa	300
gaggaugcca cgaaaaacca aaaaauguua gaagcaucug caaaguuggc uguagaagcu	360
aucgguaaua uaagaacagu gguuucucua gguugugaaa aaguauuuau ggaacaguau	420
aucaaagagu uauuaccgua ucagaaaauug gcaagaaaaa agucacauua ucguggcaua	480
auaguagguu uagcuagaag c	501

<210> 184
 <211> 490
 <212> RNA
 <213> Diabrotica virgifera

<400> 184	
gauggauauu gaucugaca gguccauucg cuuauuggaa aaugcuuuau cuaccucuaa	60
cagaggucuu uucaagaagu cauuggaaa aucaaaguua gcuacugaca auauuucuaa	120
uguguccaua gcuucugcag augaugauuu aaggauauca ucaguaaaag cuuccuacc	180
agcgauaaug cagugucuag gauacugcag ucugaucaaa cuguaacugg aaanguucuu	240
caagccagua cagcaccuug gaaaacggcu cuggauaguc uuuauaccga auuuuuugaa	300
auacuucuu cacacucagg uggcuuugau auacuggaag uaguuaccga cuuagcuagg	360
uguugcucug augcccuuaa aguaauucag aguugaagu cgaagguagc aguucgcag	420
uuagaagaag aaauaaguuu agagaaggaa aggaauacau ggagauugcu uuuuauccuu	480
uaccaagauc	490

<210> 185
 <211> 508
 <212> RNA
 <213> Tomato Golden Mosaic Virus

<400> 185
 gcucacaaaa gaugaagcgu uagagcaauu acagucaaua caacuaacuu cgaauaaacg 60
 uuauaucaag auuugcagag agcuucacga gaauggggaa ccucauaucc augcccuau 120
 ccaacuugaa gggaaagucc agaucaccaa cgaacgacag uucgaccugg uauccccaac 180
 caggucagca uauuuccauc cgaacauuca gggagcuaaa ucuaguuccg acgucaaauc 240
 auacaucgac aaagauggag auaccucga auggggagaa uuccaaaucg acggcagauc 300
 ugcuaagggga ggccagcaga cugcaaacga uucauauca aaggcgcuua acgcaguugg 360
 agugcaagaa gcacuccaaa uuuuaaagga agaacaaccu agggauuuug uuaaagauuu 420
 ucacaaucuc aaggguaacc uugagaagau auuuucaaag gcuccagaac cguggguucc 480
 uccaauuucca cuuuccucau uuaauaac 508

<210> 186
 <211> 440
 <212> RNA
 <213> Tomato Golden Mosaic Virus

<400> 186
 gccagaggag uuacagacau gggcugauga uuauuuugga aauggugccg cugcgcgag 60
 uuuaagaccu aucaguauua ucaucgaagg ugauucaaga acuggaaaaa caaugugggc 120
 ucguucauuu ggaauucau auuauucgag uggucaucua gauuucauu cuaggguuua 180
 cucaauuaau guuauguaca acgucauuga ugacguacca ccgcauuauc uaaagaugaa 240
 acacuggaaa gagcucauug gggcccagac agacuggcag accaacugua aaucgggaa 300
 acccauucaa auuaaaggug gcauuccauc aaucgugcua ugcaauccug gugagggggc 360
 uagcuauaaa uacuaccucg acaaacagga aaacucacau cucaaggcgu ggacacuua 420
 caaugcaaaa uucgucuucc 440

<210> 187
 <211> 500
 <212> RNA
 <213> Cauliflower Mosaic Virus

<400> 187
 gaaucaacca gugcuggucg uaaccgucga cgucguccgc gucgugguuc ccgcuccgcc 60
 ccuccuccg cggaugcuua cuuuagaguc uugucgcagc agcuuucgag acuuauaag 120
 acguuagcag cuggucgucc aacuauuaac caccacaaccu uuguagggag ugaacgcugu 180
 agaccugggu acacguucac aucuauuacc cuaaagccac caaaaauaga ccgugggucu 240

uauuacggua aaagguuguu acuaccugau ucagucacgg aaauaugaua gaagcuuguu 300
ucgcgcgauuc aaauucgagu uaauccuuug ccgaaauuug auucuaccgu gugggugaca 360
guccguaaag uuccugccuc cucggacuua uccguugccg ccaucucugc uauguucgcg 420
gacggagccu caccgguacu gguuuaucau uaugccgcau cuggagucca agccaacaac 480
aaacuguugu augaucuuuc 500

<210> 188
<211> 501
<212> RNA
<213> Cauliflower Mosaic Virus

<400> 188
gucguccaac uauuaaccac ccaaccuuug uagggaguga acgcuguaga ccuggguaca 60
cguucacauuc uauuaccua aagccaccaa aaauagaccg ugggucuau uacgguaaaa 120
gguguuuacu accugauuca gucacggaau augauaagaa gcuuguuucg cgcauucaaa 180
uucgaguuaa uccuuugccg aaauuugauu cuaccgugug ggugacaguc cguaaaguuc 240
cugccuccuc ggacuuauc guugccgcca ucucugcuau guucgcggac ggagccucac 300
cgguacuggu uuaucaguau gccgcaucug gaguccaagc caacaacaaa cuguuguaug 360
aucuuucggc gaugcgcgcu gauauaggug acaugagaaa guacgccguc cucguguauu 420
caaaagacga ugcgcucgag acggacgagc uaguacuua uguugacauc gagcaccaac 480
gcauucccac aucuggagug c 501

<210> 189
<211> 501
<212> RNA
<213> Tomato Spotted Wilt Virus

<400> 189
gcuuuguugc uuuguugaca caaggcaaag accuugagu uaggaagau cagaauucgg 60
uagcauucua cuucaagacu uuugucugg aaaaccuuga ccagaucaaa aagaugagcg 120
uuuuuucaug ucugacauuc cugaagaauc gucagagcau aaugaagguu auuaagcaga 180
gugauuuuac uuugguaaa auuaccuaa agaaaacuuc agacaggauu ggagccacug 240
acaugaccuu cagaaggcuu gauagcuuga ucaggguacg gcuuguugag gaaacuggga 300
auucugagaa ucucauacu aucaaaucua agauugcuuc ccacccuuug auucaagcuu 360
auggauuacc ucuugaugau gcaaagucug uagggcuugc cauaaagcug ggagguagcu 420
uaccucuau ugcucaguu gauagcuuug agaugaucag uguugucuug gcuauauauc 480
aggauagcaa auacaaggac c 501

<210> 190
 <211> 501
 <212> RNA
 <213> Tomato Spotted Wilt Virus

<400> 190
 gaccuucaga aggcuugaua gcuugaucag ggucaggcuu guugaggaaa cugggaauuc 60
 ugagaaucuc aaucuaagau ugcuucccac ccuugauuc aagcuuagg 120
 auuaccucuu gaugaugcaa agucugugag gcuugccaau augcugggag guagcuuacc 180
 ucuuauugcu ucaguugaua gcuuugagau gaucaguguu gucuuggcua uauaucagga 240
 ugcaaaauac aaggaccucg ggaucgaccc aaagaaguau gacaccaggg aagcuuuagg 300
 aaaaguuugc acugugcuga aaagcaaagc auuugagaug aaugaagauc aggugaagaa 360
 ggggaaagag uaugcugcua uacuuagcuc cagcaauccu aaugcuaaaag gaaguauugc 420
 uauggaacau uacagugaaa cucuaaaca guucuaugaa auguuugggg uaaaaaaca 480
 ggcgaaacuc acagaacuug c 501

<210> 191
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> artificial Sequence

<220>
 <223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 191
 cccaggtcat catcatgaac 20

<210> 192
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> artificial Sequence

<220>
 <223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 192
 gagctcagca aacttgacag 20

<210> 193
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> artificial Sequence

<220>
 <223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 193
 aggctttcgc tgcgtggt 18

<210> 194

<211> 19
 <212> DNA
 <213> artificial Sequence

 <220>
 <223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

 <400> 194
 tggcccatcc aaactcaga 19

 <210> 195
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> artificial Sequence

 <220>
 <223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

 <400> 195
 gctcaagttc ttcggatgac 20

 <210> 196
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> artificial Sequence

 <220>
 <223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

 <400> 196
 acttcttcca gcagactagc 20

 <210> 197
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> artificial Sequence

 <220>
 <223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

 <400> 197
 gcaaccactc ccaaatactc 20

 <210> 198
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> artificial Sequence

 <220>
 <223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

 <400> 198
 cagggttgta cccaactttc 20

 <210> 199
 <211> 20
 <212> DNA

<213> artificial Sequence

<220>

<223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 199

tctggcatca caccttctac

20

<210> 200

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial Sequence

<220>

<223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 200

ttctcacggg tagcctttgg

20

<210> 201

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial Sequence

<220>

<223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 201

tgtcctgcca tctctatctc

20

<210> 202

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial Sequence

<220>

<223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 202

acatccgaat ggtctctacg

20

<210> 203

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial Sequence

<220>

<223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 203

cacaaccgtg cagtttacag

20

<210> 204

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial Sequence

<220>
 <223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 204
 aaatgcgccc aagcatatcg 20

<210> 205
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> artificial Sequence

<220>
 <223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 205
 cagaggacga ggaatatgag 20

<210> 206
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> artificial Sequence

<220>
 <223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 206
 ctagcagcat tgtcagtagg 20

<210> 207
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> artificial Sequence

<220>
 <223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 207
 cggtgttcga cagcagctac 20

<210> 208
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> artificial Sequence

<220>
 <223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 208
 cttcgccgcc aacaataccc 20

<210> 209
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> artificial Sequence

<220>
 <223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 209
gcgcaagttt ttcgtagatg ac 22

<210> 210
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial Sequence

<220>
<223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 210
accatagtcc acagatgaca c 21

<210> 211
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial Sequence

<220>
<223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 211
gctgcgtggt gtgcgttctg 20

<210> 212
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial Sequence

<220>
<223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 212
tcgtcgctg ctgtctgttc 20

<210> 213
<211> 18
<212> DNA
<213> artificial Sequence

<220>
<223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 213
aggctttcgc tgcgtggt 18

<210> 214
<211> 19
<212> DNA
<213> artificial Sequence

<220>
<223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 214

tggcccatcc aaactcaga 19

<210> 215
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial Sequence

<220>
<223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 215
gctcaagttc ttcggatgac 20

<210> 216
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial Sequence

<220>
<223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 216
acttcttcca gcagactagc 20

<210> 217
<211> 19
<212> DNA
<213> artificial Sequence

<220>
<223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 217
ggatgctact cgccagaca 19

<210> 218
<211> 19
<212> DNA
<213> artificial Sequence

<220>
<223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 218
gtggtcagcc tgcttcaac 19

<210> 219
<211> 22
<212> DNA
<213> artificial Sequence

<220>
<223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

<400> 219
gcgcaagttt ttcgtagatg ac 22

<210> 220
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> artificial Sequence

 <220>
 <223> polynucleotide sequence or in vitro generated dsRNA

 <400> 220
 accatagatcc acagatgaca c

21

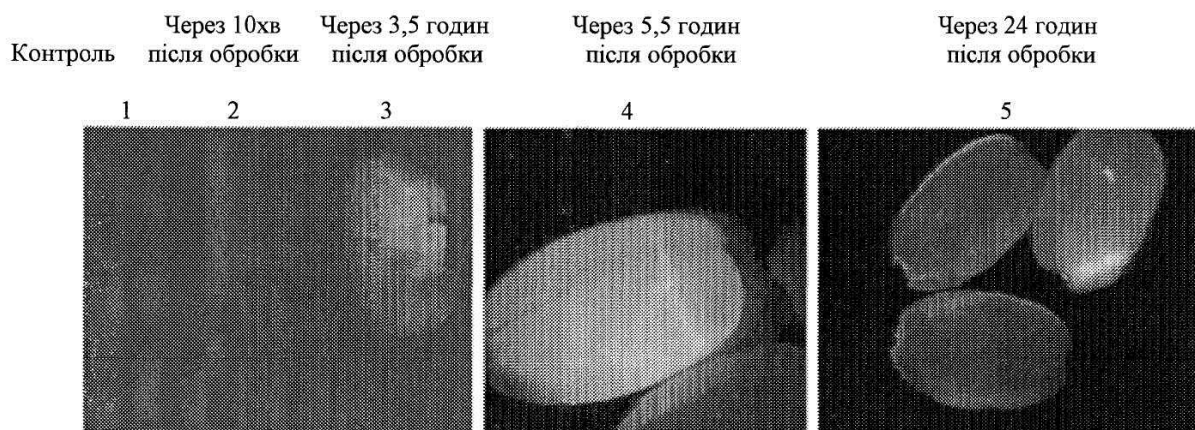
ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Спосіб формування рослини, яка має підвищену стійкість до комах-шкідника, причому згаданий спосіб включає:
 - (a) праймінг насінини перед контактом насінини з молекулою голої дволанцюгової РНК (длРНК), причому праймінг здійснюють шляхом:
 - (i) промивання насінини перед вказаним контактуванням насінини; і
 - 10 (ii) сушіння насінини після етапу (i);
 - (b) причому згадана насінина напряду контактує зі згаданою молекулою длРНК, причому згадана гола длРНК включає щонайменше один ланцюг полінуклеотидів, що містить принаймні один сегмент зі щонайменше 18 суміжних нуклеотидів гена комах-шкідника або послідовність РНК, транскрибовану зі згаданого гена, який **відрізняється** тим, що згаданий контакт
 - 15 здійснюють шляхом замочування насінини у розчині, що містить кінцеву концентрацію від 0,0005 мкг/мкл до 3 мкг/мкл згаданої молекули голої длРНК, та збовтування насінини у цьому розчині протягом від 4 до 24 годин, причому молекула голої длРНК вводиться у згадану насінину, проте не експресується з геному рослини, тобто не стає невід'ємним елементом геному; і
 - 20 (c) пророщування насінини для отримання рослини, яка проявляє поліпшену стійкість до цієї комах-шкідника в порівнянні з контрольною рослиною.
2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що рослиною є кукурудза, соя, рис, пшениця, томат, огірок, салат, бавовна або ріпак.
3. Спосіб за п. 1 або 2, який **відрізняється** тим, що комахою-шкідником є *Spodoptera littoralis*,
 - 25 *Diabrotica virgifera virgifera* або *Leptinotarsa decemlineata*.
4. Спосіб за будь-яким з пп. 1-3, який **відрізняється** тим, що ген комах-шкідника вибирають з групи, що складається з АТФази, NADPH-(цитохром Р450)-оксидоредуктази, IAP, хітинсинтази, EF1α і β-актину.
5. Спосіб за будь-яким з пп. 1-4, який **відрізняється** тим, що молекула голої длРНК, крім того,
 - 30 включає послідовність нуклеїнової кислоти, яка щонайменше на 80 % ідентична ендегенному гену рослини щонайменше на 25 послідовних нуклеотидів.
6. Спосіб за будь-яким з пунктів 1-5, який **відрізняється** тим, що насінину, крім того, обробляють агентом, що вибирається з групи, яка складається з пестициду, фунгіциду, інсектициду, добрива, покриваючого засобу і фарбуючого засобу.
7. Спосіб за будь-яким одним з пп. 1-6, який **відрізняється** тим, що промивання здійснюють у присутності двічі деіонізованої води.
8. Спосіб за будь-яким одним з пп. 1-7, який **відрізняється** тим, що промивання здійснюють протягом 2-6 годин.
9. Спосіб за будь-яким одним з пп. 1 - 8, який **відрізняється** тим, що промивання здійснюють
 - 40 при 4-28 °С.
10. Спосіб за будь-яким одним з пп. 1-9, який **відрізняється** тим, що сушіння здійснюють при 25-0 °С протягом 10-16 годин.
11. Спосіб за будь-яким одним з пп. 1-10, який **відрізняється** тим, що молекулу голої длРНК вводять в насінину в розчині, що включає 0,1 мМ ЕДТА.
- 45 12. Спосіб за будь-яким одним з пп. 1-11, який **відрізняється** тим, що молекула голої длРНК присутня в ендоспермі насінини.
13. Спосіб за будь-яким одним з пп. 1-12, який **відрізняється** тим, що молекула голої длРНК є у зародку насінини.

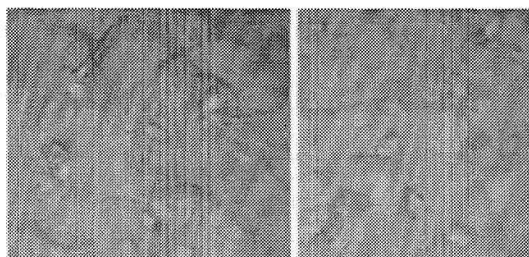
14. Спосіб за будь-яким одним з пп. 1-13, який **відрізняється** тим, що молекула голої длРНК присутня в подібній концентрації в зародку і ендоспермі насінини.
15. Спосіб за будь-яким одним з пп. 1-14, який **відрізняється** тим, що молекула голої длРНК присутня в більш високій концентрації в ендоспермі, ніж у зародку насінини.
- 5 16. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що згадана рослина не містить виявлюваного рівня молекули голої длРНК.

Флуоресцентна мала інтерферуюча РНК в рисі (рис посівний) екзогенна

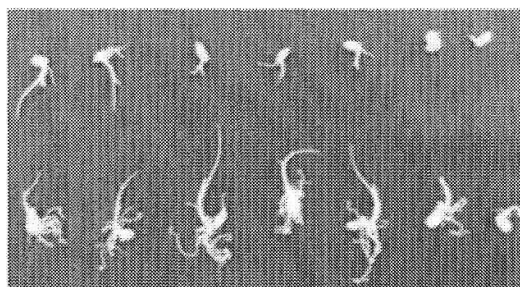
- період часу



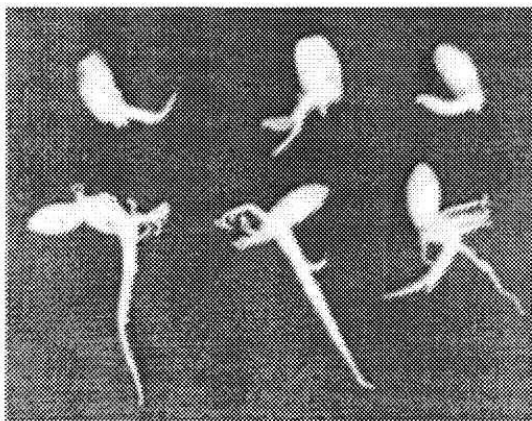
Фіг.1



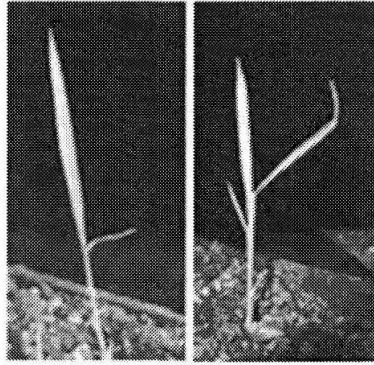
Фіг.2А



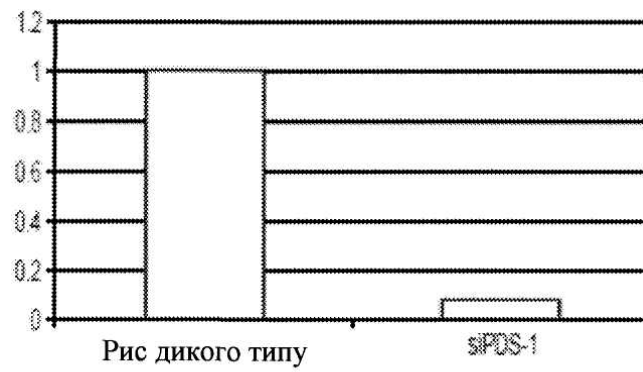
Фіг.2В



Фіг.3А



Фіг.3В

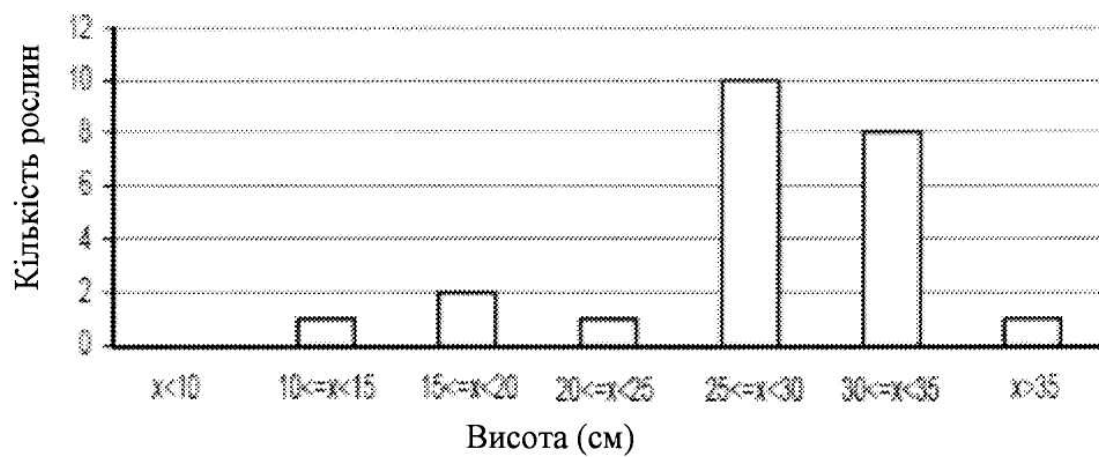


Фіг.3С

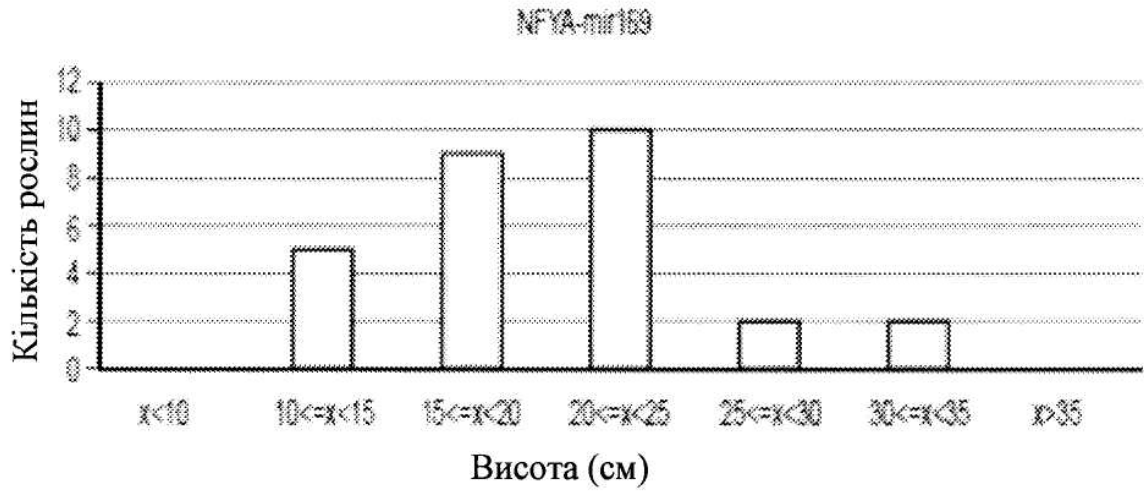
Обробка насіння томату dsRNA NFY (мішень miR169)

Через 55 діб після обробки ORA SEED™

Контрольна рослина

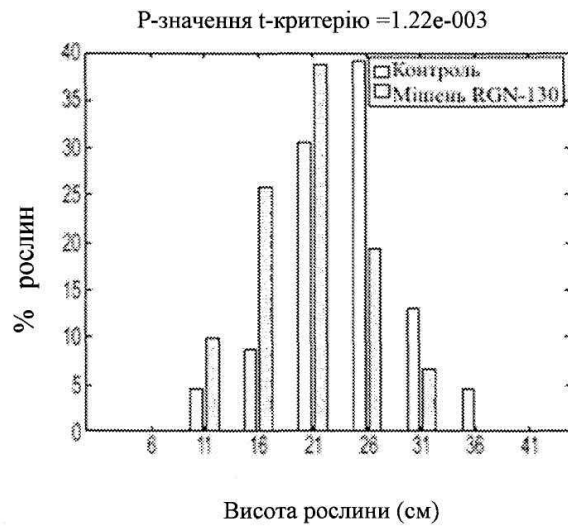


Фіг. 4А

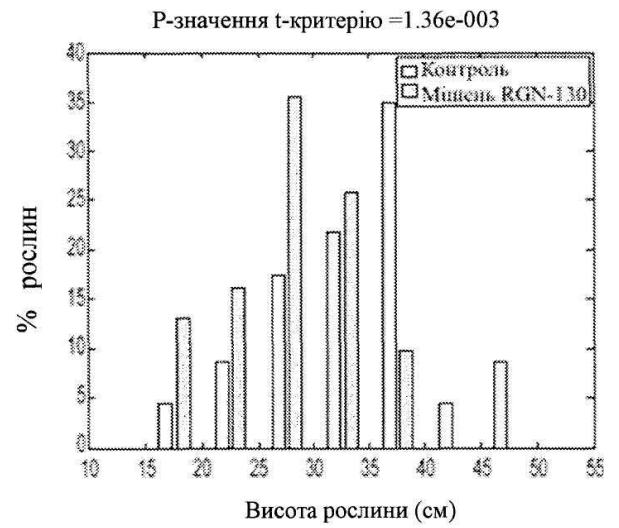


Фіг. 4В

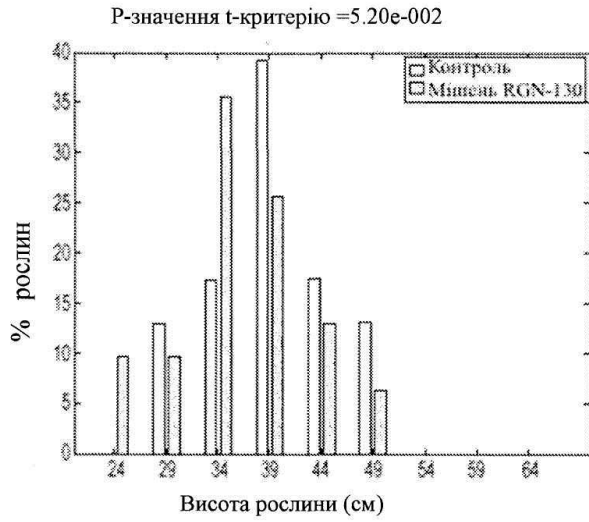
Обробка насіння томату dsRNA ARF8 (мішень mir167)



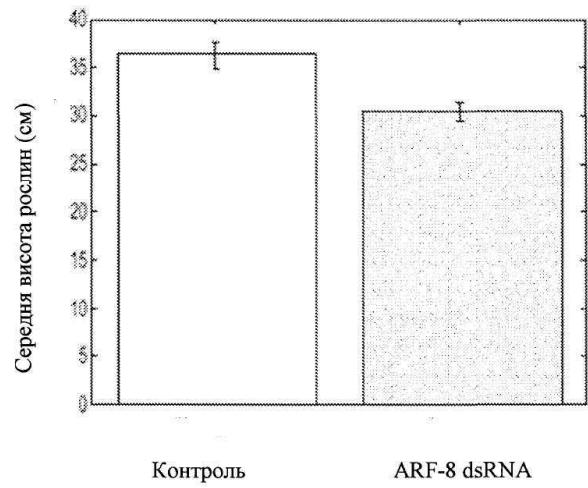
Фіг.5А



Фіг.5В

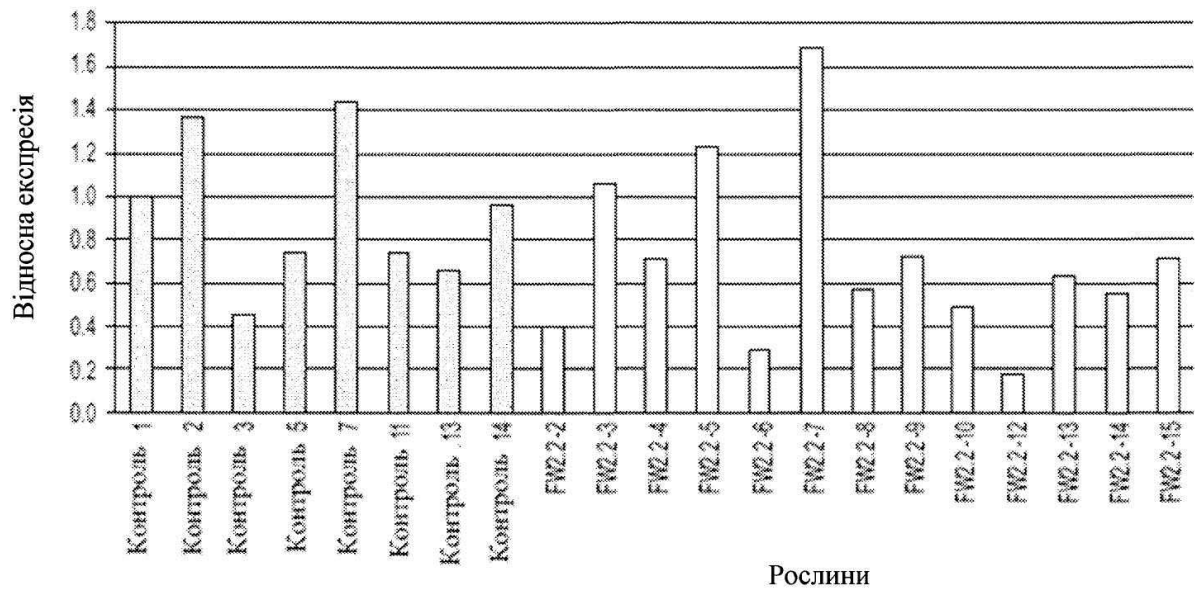


Фіг.5С

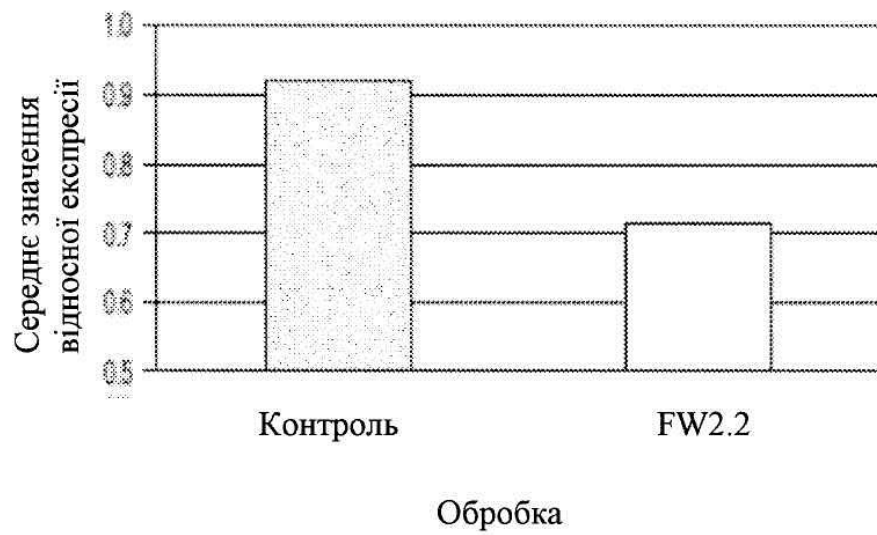


Фіг.5D

Обробка насіння томату dsRNA FW2.2



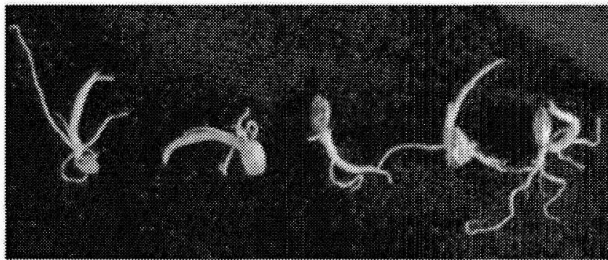
Фіг.6А



Фиг.6B

Обробка насіння рису dsRNA DELLA

Контрольне насіння



Фиг.7A

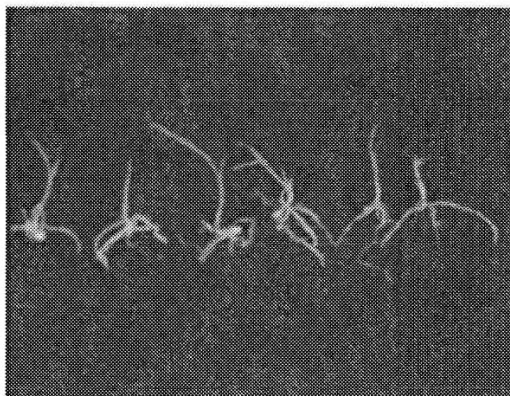
Насіння, оброблене DELLA



Фиг.7B

Обробка насіння рису dsRNA NRR

Контроль



Фиг.8A

Оброблене



Фиг.8B

NADPH-DS#1

ОЦІНКА	ОЧІКУВАННЯ	ГЕПИ	ЛАНЦЮГ	ФРЕЙМ
ІДЕНТИЧНІСТЬ				

64.4 BITS(70)	3E-09%	5871(82%)	4/71(5%)	плюс/плюс
---------------	--------	-----------	----------	-----------

ОЗНАКИ

QUERY	27	TTGGGCTTGGAGATGATGACGCTAAT--ATTGAAGATGACTTTATCACTGGAAAGAAA
SBJCT	864	TTGGTCITGGAGATGATGA--CCAATGCATTGAGGATGACTTCAACACATGGAAAGAAAC
	921	

QUERY	85	GTTCTGGCCAG	95
SBJCT	922	TCTCTGGCCAG	932

NADPH-DS2

ОЦІНКА	ОЧІКУВАННЯ	ГЕПИ	ЛАНЦЮГ	ФРЕЙМ
ІДЕНТИЧНІСТЬ				

46.4 BITS(50)	8e-04%	31/35(89%)	0/35(0%)	плюс/плюс
---------------	--------	------------	----------	-----------

ОЗНАКИ

QUERY	351	CCTCGCCTACAAACCAAGATACTACTOCATCTCATC	385
SBJCT	1604	CCTCGCCTTCAACCAAGATACTATTCTATTTCATC	1638

Fig.9A

ATPASE-DS1

ОЦІНКА ОЧІКУВАННЯ ГЕПИ ЛАНЦЮГ ФРЕЙМ
ІДЕНТИЧНІСТЬ

251 BTS(278) LE-45() 348484(72%) 10/484(2%) плюс/минус

ОЗНАКИ

```

QUERY 27      GGAAAGCCCATTTGACAAGGGTCCCCCAATCCTCGCGAGGACTTCTTGGACATCCAGGGA 86
              ||||| || ||||| || ||||| || | | || | || ||||| || ||
SUBJECT 462    GGAAACCTATTGACAATGGCCCCCGATATTACCTGAAGCCTACTTGGATATCTCTGGA 521

QUERY 87      CAGCCCATCAACCCATGGTCCCGTATCTAOCCTGAGGAGATGATCCAGACTGGTATCTCC 146
              || || || || | | | || || || ||||| ||||| || || ||
SUBJECT 522    AGTTCTATTAATCCCACTGAGAGAACCTATCCAGAGGAGATGATCCAAACTGGGATATCC 581

QUERY 147     GCTATCGACSTGATGAACATTCATTGCTCGTGGTCAGAAGATCCCATCTTCTCTGCGCT 206
              | || || ||||| ||||| ||||| || || ||||| | || ||||| ||
SUBJECT 582    ACCATTGATGTGATGAACATTCATTGCTCGTGGGCAAAAAATCCCTATTCTCTGCTGCT 641

QUERY 207     GGTCTGCCCCACAATGAAATTGCCGCCAGATCTGTAGACAGGCTGGTCTTGTTAAGATC 266
              || || || ||||| ||||| || ||||| || ||||| || ||||| ||||
SUBJECT 642    GGACTCCCTCACAATGAAATTGCTGCTCAGATCTGTCTGTGAGGCTGGCCTTGTAAGACA 701

```

Fig.9B

```

QUERY 267     CCG-----GCAAATCA-GTGTGGATGACCACGAGGACAACCTTCGCATCGTATTCGCA 320
              | | | || || | | || || || ||||| || || || || ||
SUBJECT 702    TTGGAGAAAGGAAAGCATGCAAGGGTGGTGAAGATGACAACCTTGTATTTGTGTTTGTCT 761

QUERY 321     GCTATGGGTGTGAACATGGAAACGGCCCGGTCTTCAAACAGGACTTCGAAGAGAAAGGT 380
              ||||| ||||| ||||| || | ||||| || || ||||| |||||
SUBJECT 762    GCTATGGGAGTGAACATGGAAACAGCTCAATCTTCAAACGTGATTTTGAAGAGAAAGGT 821

QUERY 381     TCTATGGAGAACGTGT--GCTGTCTCTGAACTTGGCCAATGACCCCACTATTGAGAGAA 438
              || || | ||||| || || || || || || ||||| ||||| || ||
SUBJECT 822    TCCATG--GAAAGGGTCACCTTTTCTGAACTCTGGCTAATGATCCACCATTGAACGTA 879

QUERY 439     TTATCACACCCCGTCTTGCTTTGACTGCTGCCGAGTCTTGGCTTACCACTGCGAGAAC 498
              ||||| || || ||||| || || | || || || ||||| || || || || ||
SUBJECT 880    TTATCACCCCTCGGATTGCTCTAACAACAGCAGAAATATTGGCATATGAATGTGGGAAGC 939

QUERY 499     ACGT 502
              ||
SUBJECT 940    ATGT 943

```

Fig.9B

ПРОДОВЖЕННЯ

IAP-DS1

ОЦІНКА	ОЧІКУВАННЯ	ІДЕНТИЧНІСТЬ	ГЕПИ	ЛАНЦЮГ	ФРЕЙМ
37.4 BITS(40)	0.43()	22/23(96%)	0/23(0%)	плюс/плюс	

ОЗНАКИ

QUERY	2	TAATAAGACTCACTATAGGGAGA	24
SEJCT	441	TAATAAGACTCACTATAGGGAGA	463

IAP-DS2

ОЦІНКА	ОЧІКУВАННЯ	ІДЕНТИЧНІСТЬ	ГЕПИ	ЛАНЦЮГ	ФРЕЙМ
35.6 BITS(38)	1.5()	19/19(100%)	0/19(0%)	плюс/плюс	

ОЗНАКИ

QUERY	444	CCGGTACCTCTCCGCCACG	462
SEJCT	607	CCGGTACCTCTCCGCCACG	625

Fig.9C

NADPH-DS1
~~~~~

| ОЦІНКА        | ОЧІКУВАННЯ | ГЕПИ       | ЛАНЦЮГ   | ФРЕЙМ     |
|---------------|------------|------------|----------|-----------|
| ІДЕНТИЧНІСТЬ  |            |            |          |           |
| 42.8 BITS(46) | 0.021()    | 28/30(93%) | 1/30(3%) | плюс/плюс |

ОЗНАКИ:

|       |     |                                |     |
|-------|-----|--------------------------------|-----|
| QUERY | 2   | TAATACGACTCACTATAGGGAGAACTTGGG | 31  |
|       |     |                                |     |
| SBJCT | 283 | TAATACGACTCACTATAGGGCGAA-TTGGG | 311 |

ANOTHER SEGMENT:

| ОЦІНКА        | ОЧІКУВАННЯ | ГЕПИ        | ЛАНЦЮГ   | ФРЕЙМ     |
|---------------|------------|-------------|----------|-----------|
| ІДЕНТИЧНІСТЬ  |            |             |          |           |
| 37.4 BITS(40) | 0.91()     | 20/20(100%) | 0/20(0%) | плюс/плюс |

ОЗНАКИ:

|       |     |                      |     |
|-------|-----|----------------------|-----|
| QUERY | 523 | CCCTATAGTGAGTCGTATTA | 542 |
|       |     |                      |     |
| SBJCT | 755 | CCCTATAGTGAGTCGTATTA | 774 |

NADPH-DS2  
~~~~~

ОЦІНКА	ОЧІКУВАННЯ	ГЕПИ	ЛАНЦЮГ	ФРЕЙМ
ІДЕНТИЧНІСТЬ				
39.2 BITS(42)	0.26()	21/21(100%)	0/21(0%)	плюс/плюс

ОЗНАКИ:

QUERY	189	GATGAAGAAGACAAAAAGAAA	209
SBJCT	42818	GATGAAGAAGACAAAAAGAAA	42838

Fig.10A

ATP2B8-051

ОЦІНКА	ОЧІКУВАННЯ	ГЕПІ	ЛАНЦЮГ	ФРЕЙМ
	ІДЕНТИЧНІСТЬ			

214 BPS(23%) 64-54) 263(39/73%) 9359(2%) nnoC/nnoC

ОЗНАКИ:

QUERY	114	TACCCGGAGGAGATGATCCAGACTGGTATCTCCGCATTCGACGTGATGAACCTCATTGCT	173
SBJCT	487	TATCCTGAAGAAATGATACAGACAGGAATTTCCACAGTAGACGTCAATGAATTCAATTGCT	546
QUERY	174	CGTGCTCAGAAGATCCCATCTTCTCTGCCGCTGGICTSCCCOCACAATGAAAATTGCCGCC	233
SBJCT	547	AGAGGGCAGAAGATTCCCTCTTTCTCTGTGTGCTGGICTTCTCTCATTAATGAAATTGCAGCC	606
QUERY	234	CAGATCTGTAGACAGGCCGGTCTGTGTTAAGATCCCGGCCAAATCAG-----TGTTG---	284
SBJCT	607	CAGATCTCTCTCAGGCTGGACTGGTGAAGAGGTTGGAAAAATCTGACAACTTCTTGAG	666
QUERY	285	GATGACCACGAGGACAACTTCGCCATCTGATTCGCAGCTATGGGTGTGAACATGGAAACC	344
SBJCT	667	GGTGCTGAAGAGGACAAATTTGCCATAGTCTTTGCTGCTATGGGAGTCAACA TGGAAACA	726
QUERY	345	GCCTGGTCTTCAAACAGGACTTCSAAGAGAACGGTTCTATGGAGAACGTGTGCTGTTC	404
SBJCT	727	GCACAAATTTTCAAACGTGATTTGAGGAAAATGSATCTATGGAGAGAGTGACACTTTTC	786
QUERY	405	TTGACTTGGCCAATGACCCCACTATTGAGAGAAATATCACACCCCGTCTTGCTTTGAC	463
SBJCT	787	TTAAACCTGGCCAATGATCCTACTATAGCGGTATTATTACTCCGAGGATGCTCTGAC	846

Fig. 10B

IAP1-DS1

ОЦІНКА	ОЧІКУВАННЯ	ГЕПІ	ЛАНЦЮГ	ФРЕЙМ
	ІДЕНТИЧНІСТЬ			

```
37/4 BITS(40) 0.91() 22/23(96%) 0/23(0%) nnoc/nnoc
```

ОЗНАКИ:

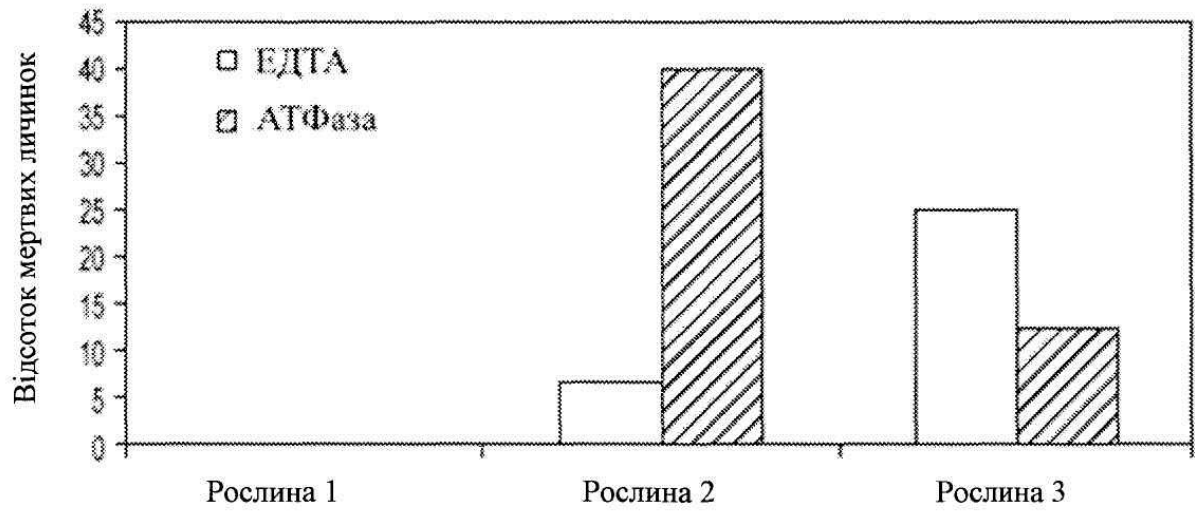
```

QUERY 501      TCTCCCTATAGTGAGTCGTATTA 523
              || ||||| ||||| ||||| |||||
SBJCT 90683    TCGCCCTATAGTGAGTCGTATTA 90705

```

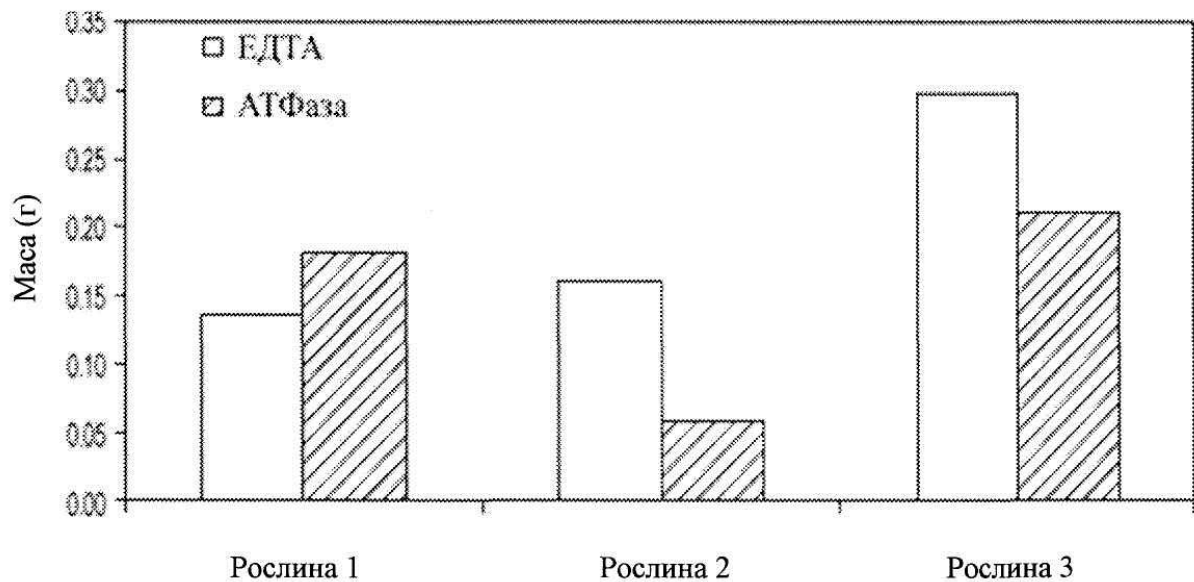
Fig. 10C

Відсоток мертвих личинок *S. Littoralis* після годування
рослинами, обробленими АТФазою, протягом 8 діб



Фіг.11А

Середня маса *S. Littoralis* після годування
рослинами, обробленими АТФазою, протягом 8 діб



Фіг.11В

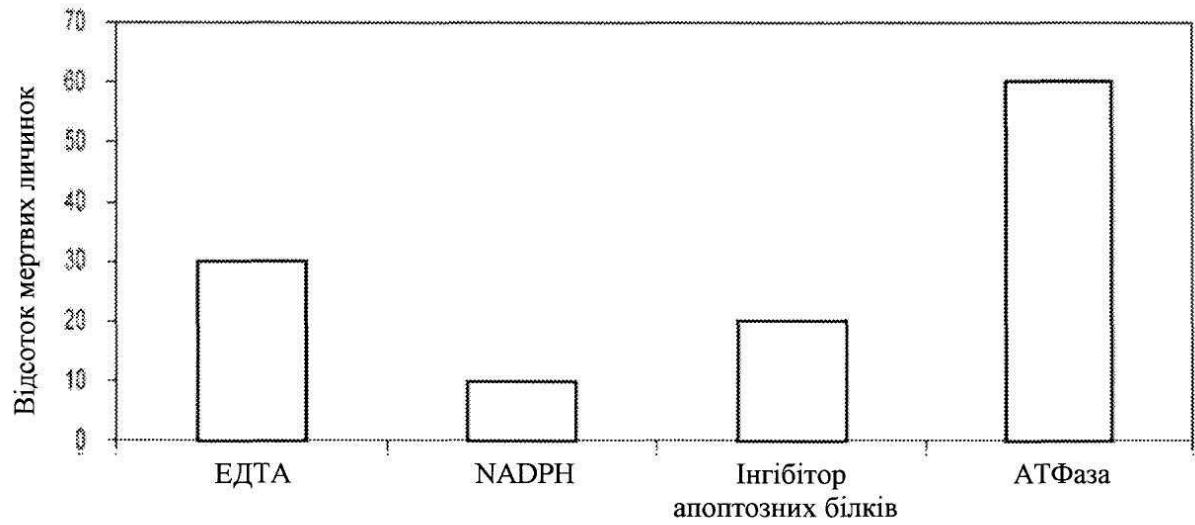


Фіг.11С



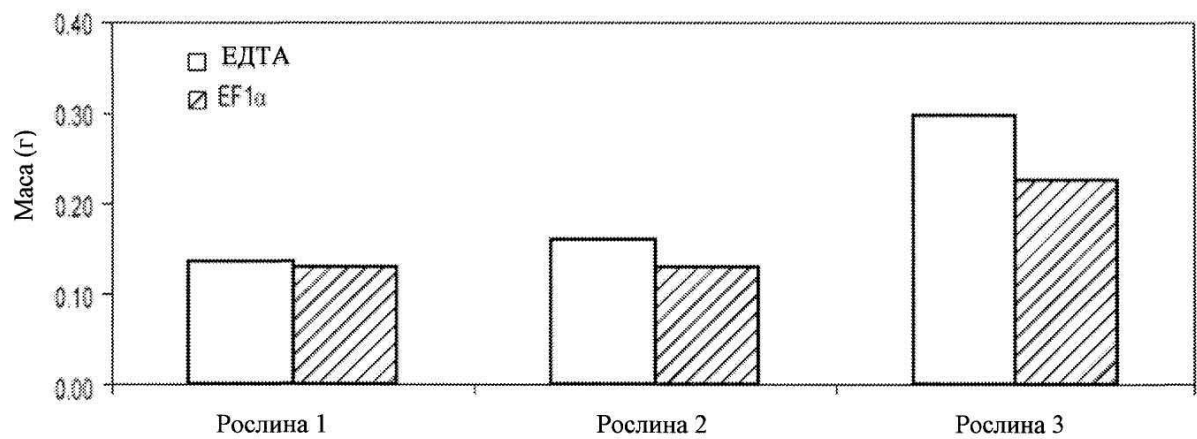
Фіг.11D

Відсоток мертвих личинок після годування обробленими
рослинами протягом 7 діб



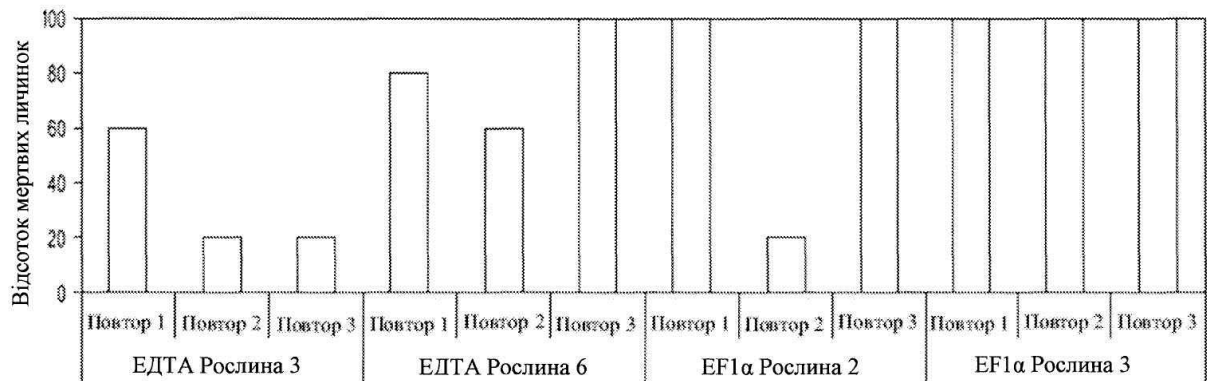
Фіг.12

Середня маса *S. Littoralis* після годування
рослинами, обробленими EF1 α , протягом 8 діб



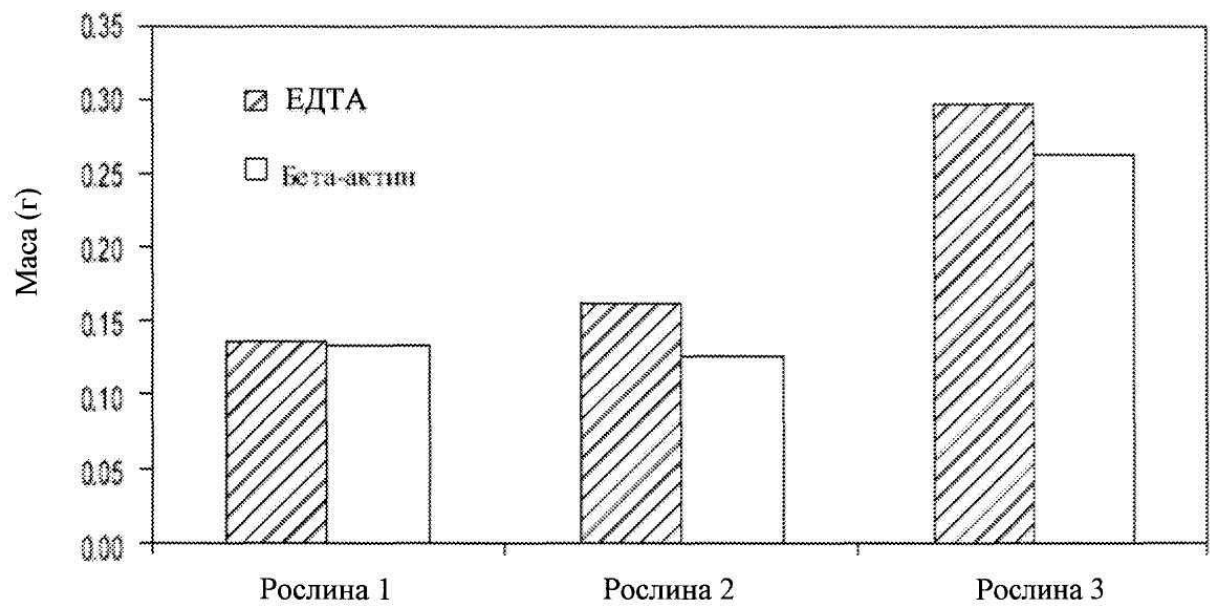
Фіг.13А

Відсоток мертвих личинок після годування обробленими
рослинами протягом 5 діб



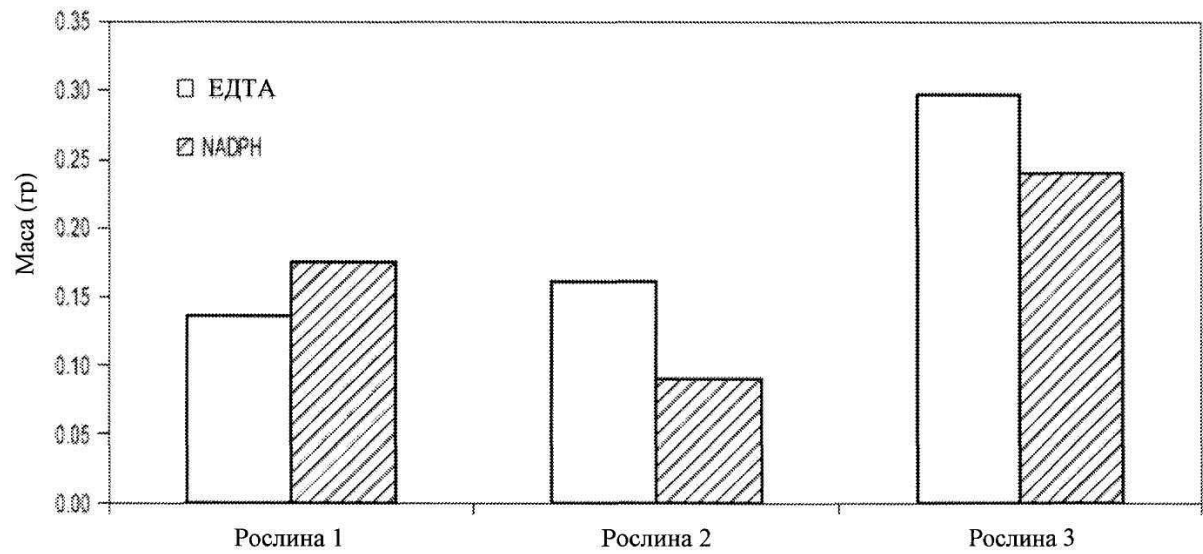
Фіг.13В

Середня маса *S. Littoralis* після годування
рослинами, обробленими бета-актином, протягом 8 діб



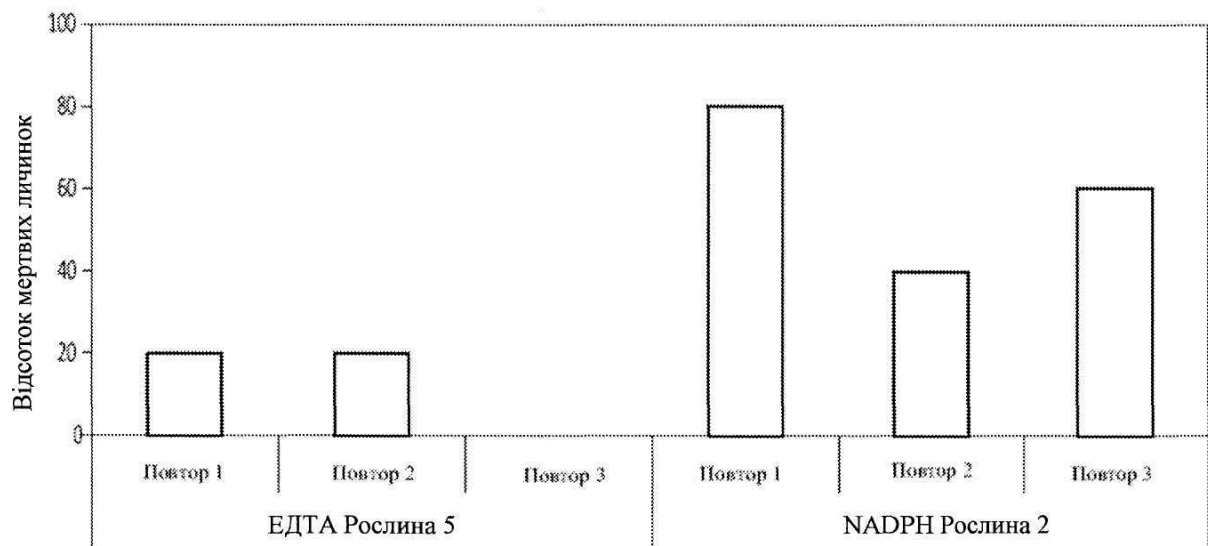
Фіг.14

Середня маса *S. Littoralis* після годування
рослинами, обробленими NADPH, протягом 8 діб



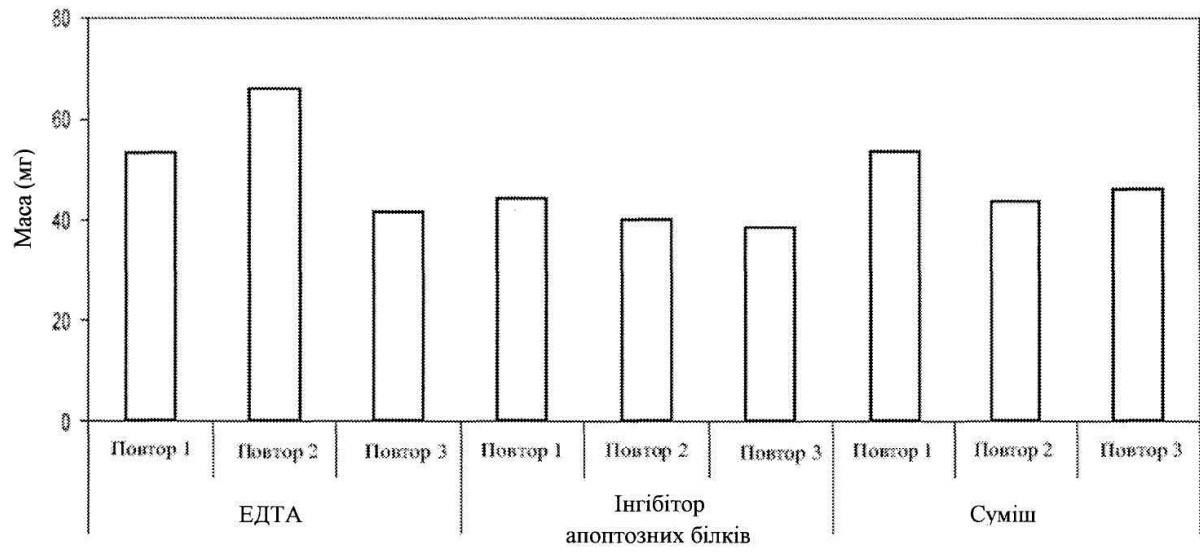
Фіг.15А

Відсоток мертвих личинок після годування обробленими
рослинами протягом 7 діб



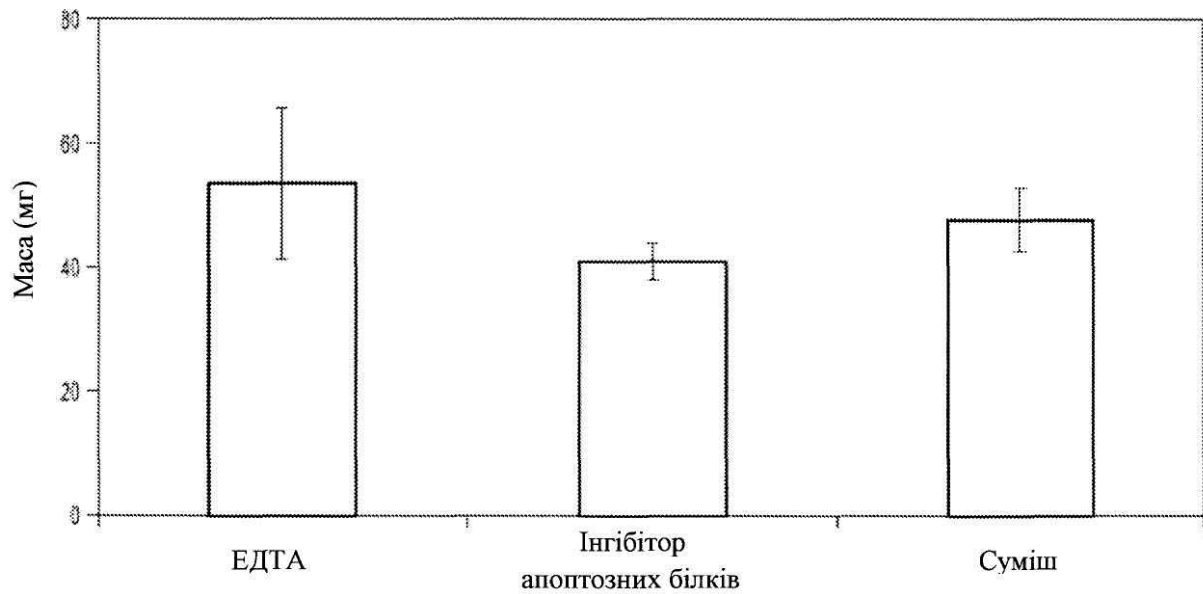
Фіг.15В

Середня маса *S. Littoralis* на один повтор після годування
обробленими рослинами протягом 6 діб



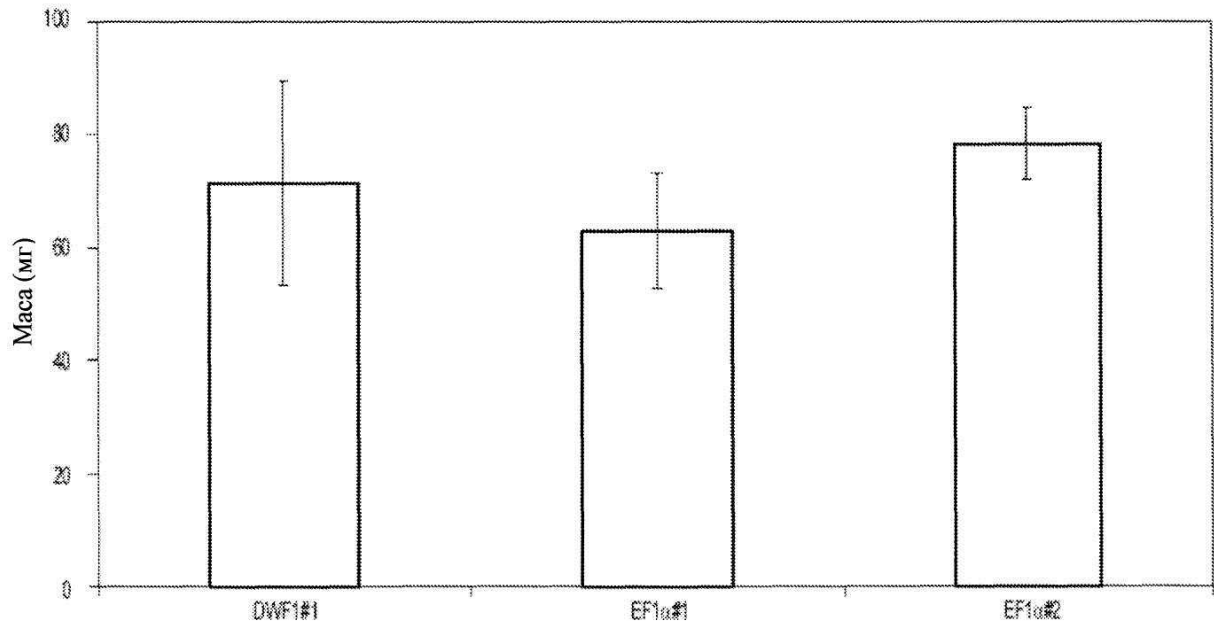
Фіг.16А

Середня маса *S. Littoralis* на одну обробку після годування
обробленими рослинами протягом 6 діб



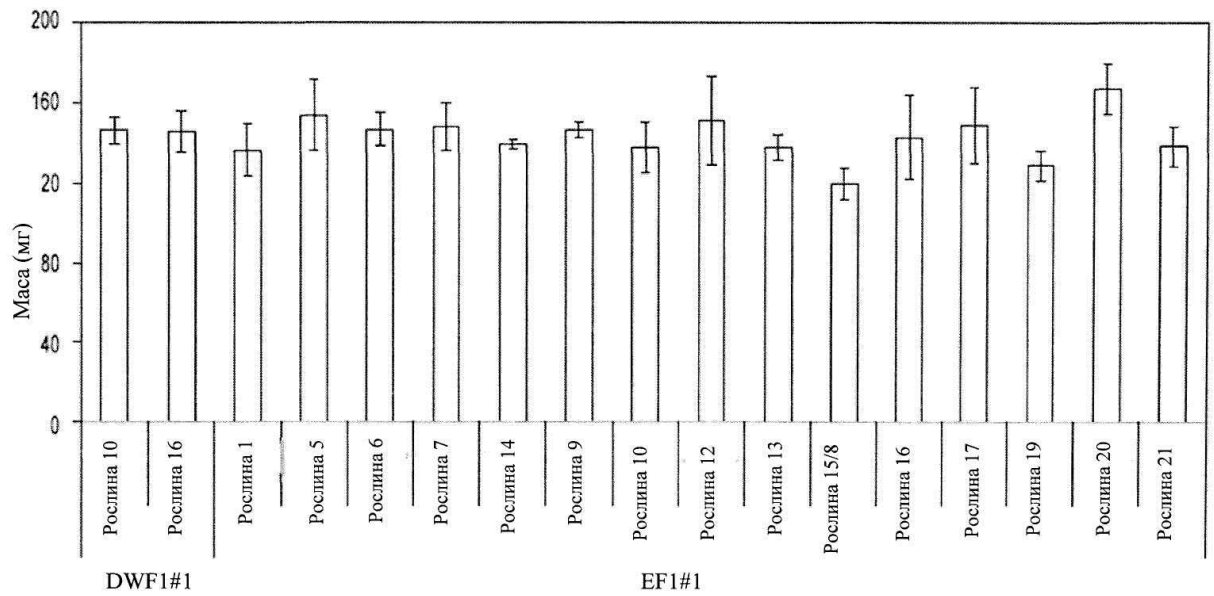
Фіг.16В

Середня маса *S. Littoralis* на одну обробку після годування
обробленими рослинами протягом 9 діб



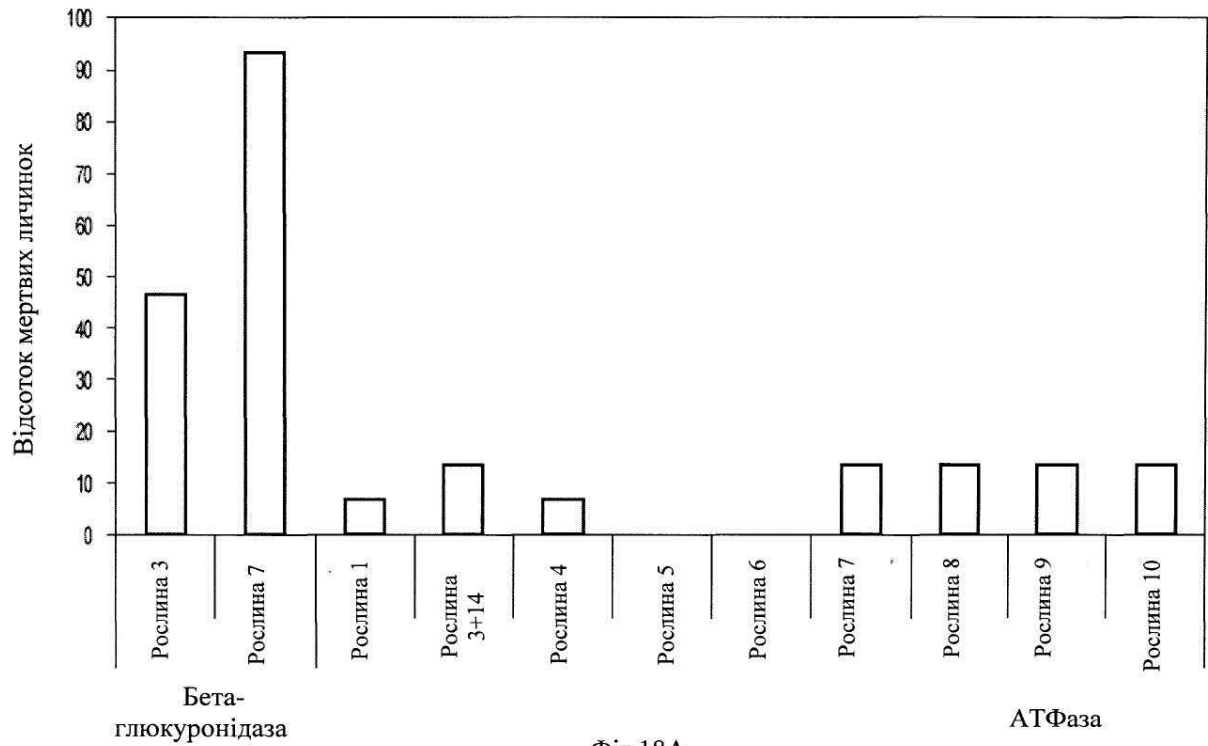
Фіг.17А

Середня маса *S. Littoralis* на одну рослину після годування
обробленими рослинами протягом 5 діб



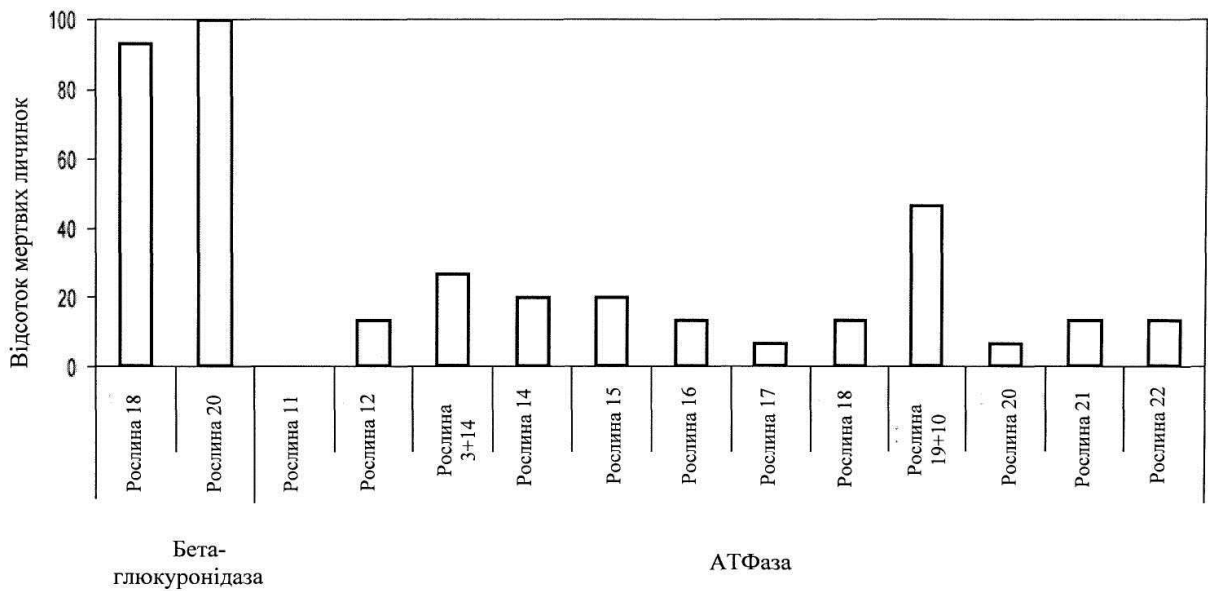
Фіг.17В

Відсоток мертвих личинок після годування обробленими
рослинами протягом 12 діб



Фіг.18А

Відсоток мертвих личинок після годування обробленими
рослинами протягом 4 діб



Фіг.18В

Середня маса *S. Littoralis* на одну рослину після годування
обробленими рослинами протягом 10 діб

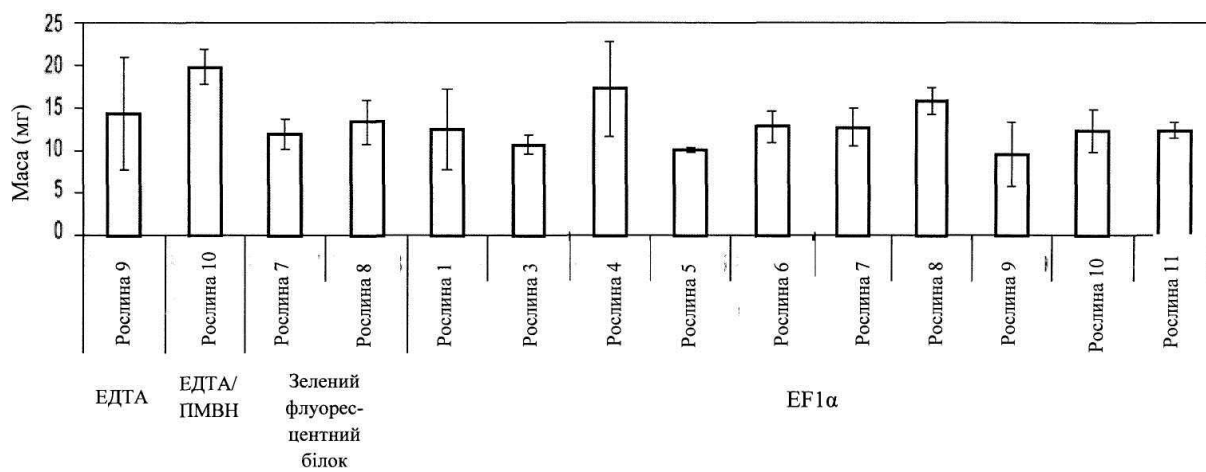


Fig.19A

Середня маса *S. Littoralis* на одну рослину після годування
обробленими рослинами протягом 10 діб

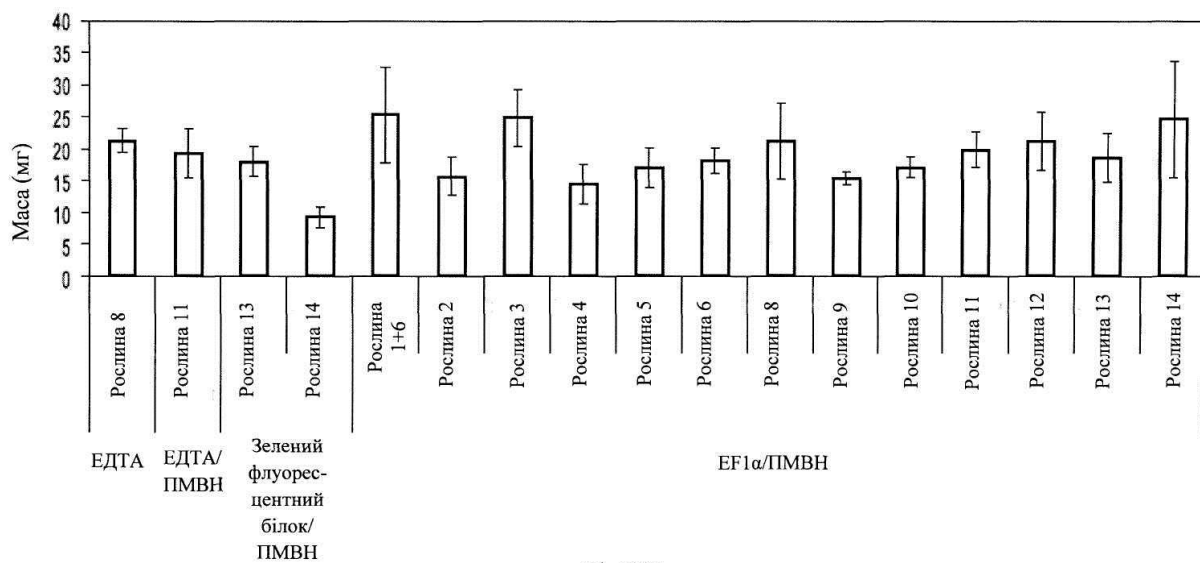
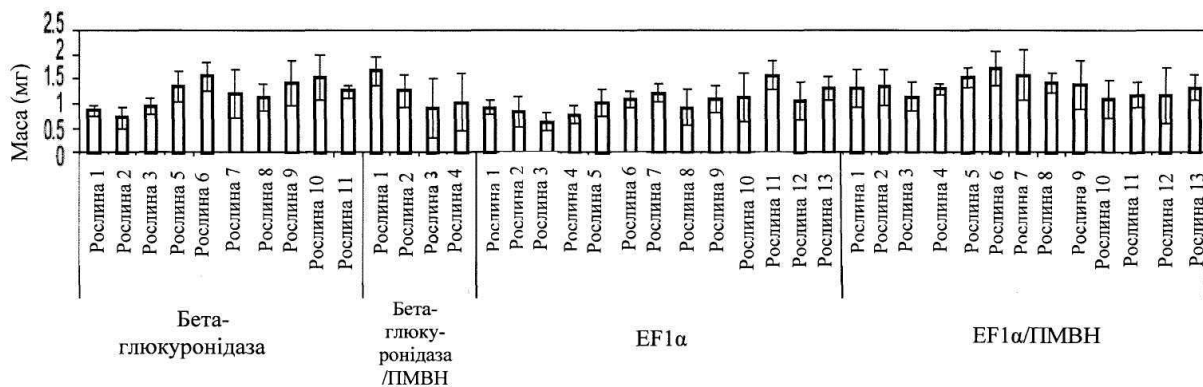


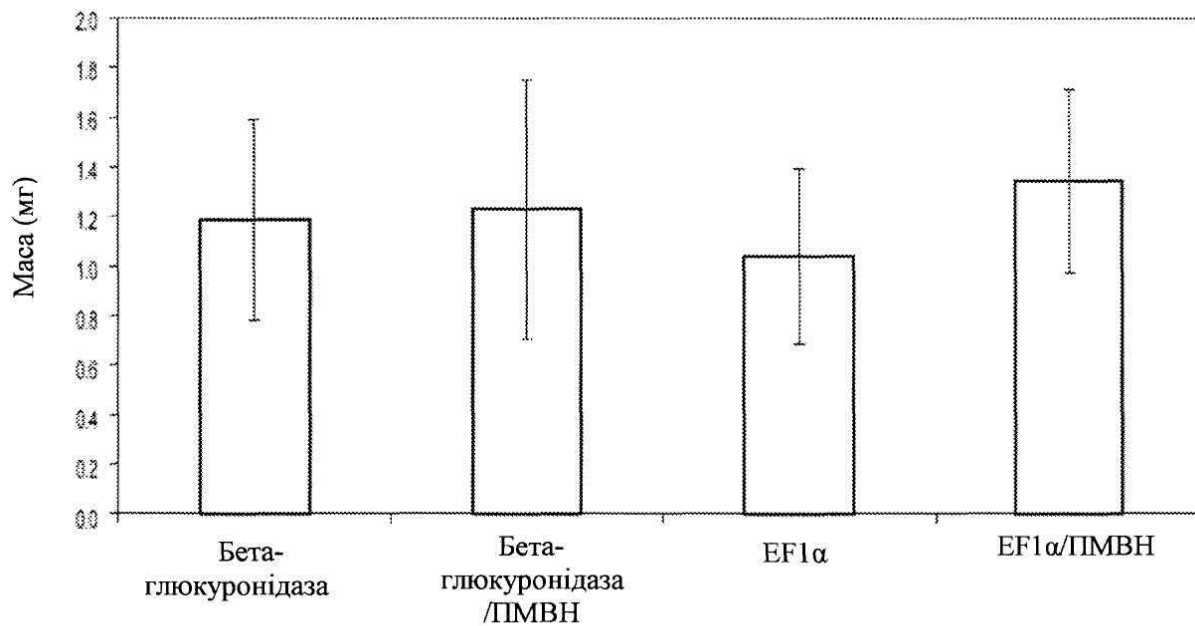
Fig.19B

Середня маса *S. littoralis* на одну рослину після годування
обробленими рослинами протягом 4 діб



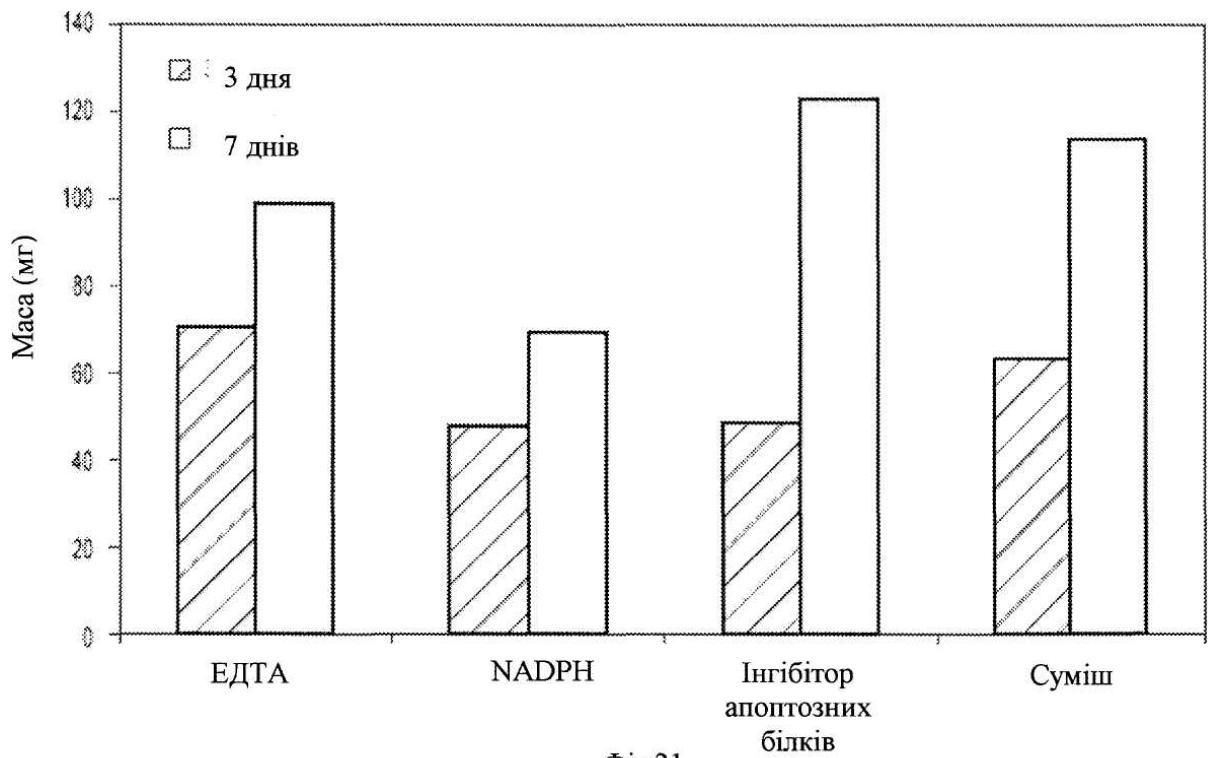
Фіг.20А

Середня маса *S. littoralis* на одну рослину після годування
обробленими рослинами протягом 4 діб



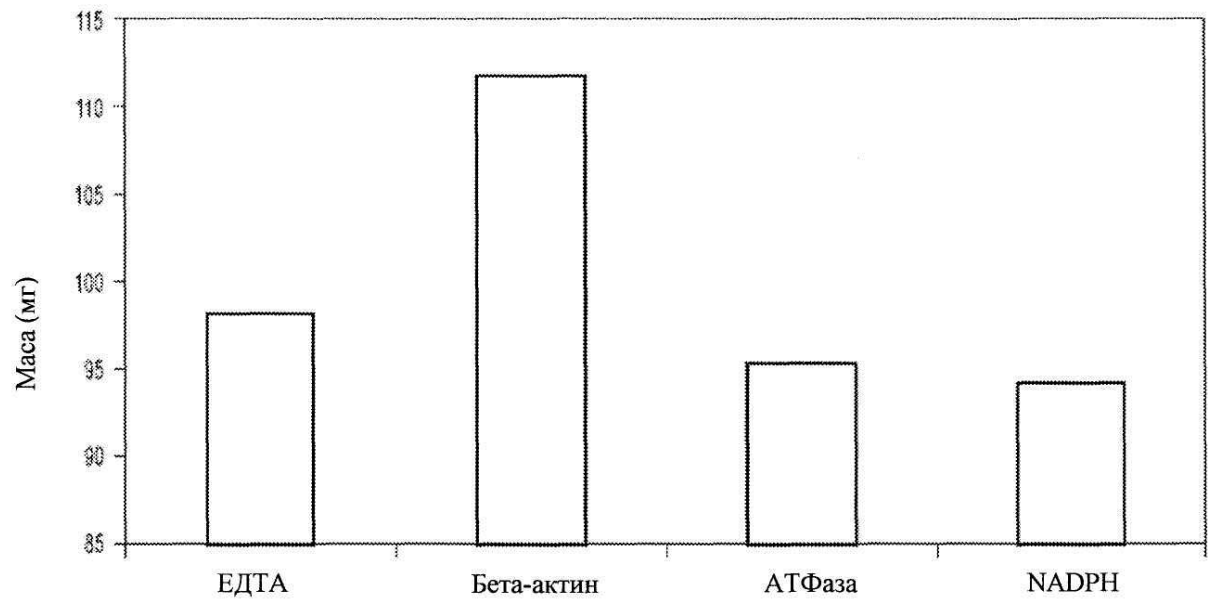
Фіг.20В

Середня маса *S. Littoralis* на одну рослину після годування
обробленими рослинами протягом 3 та 7 діб



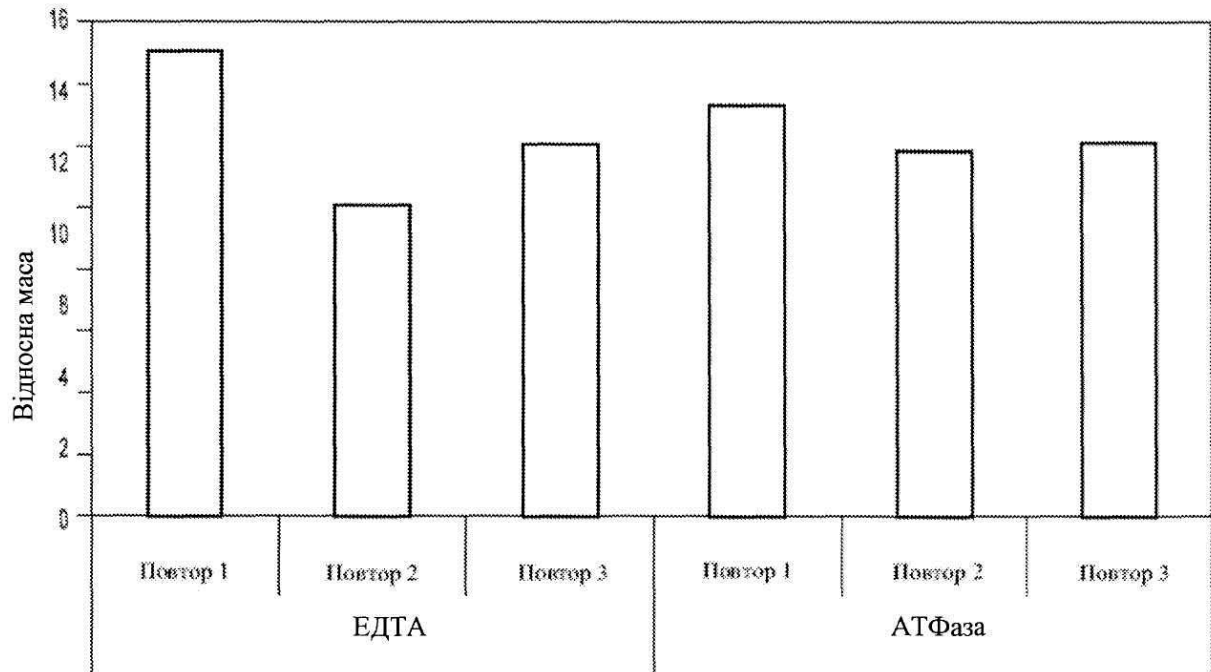
Фіг.21

Середня маса *S. Littoralis* на одну обробку після 4 діб годування



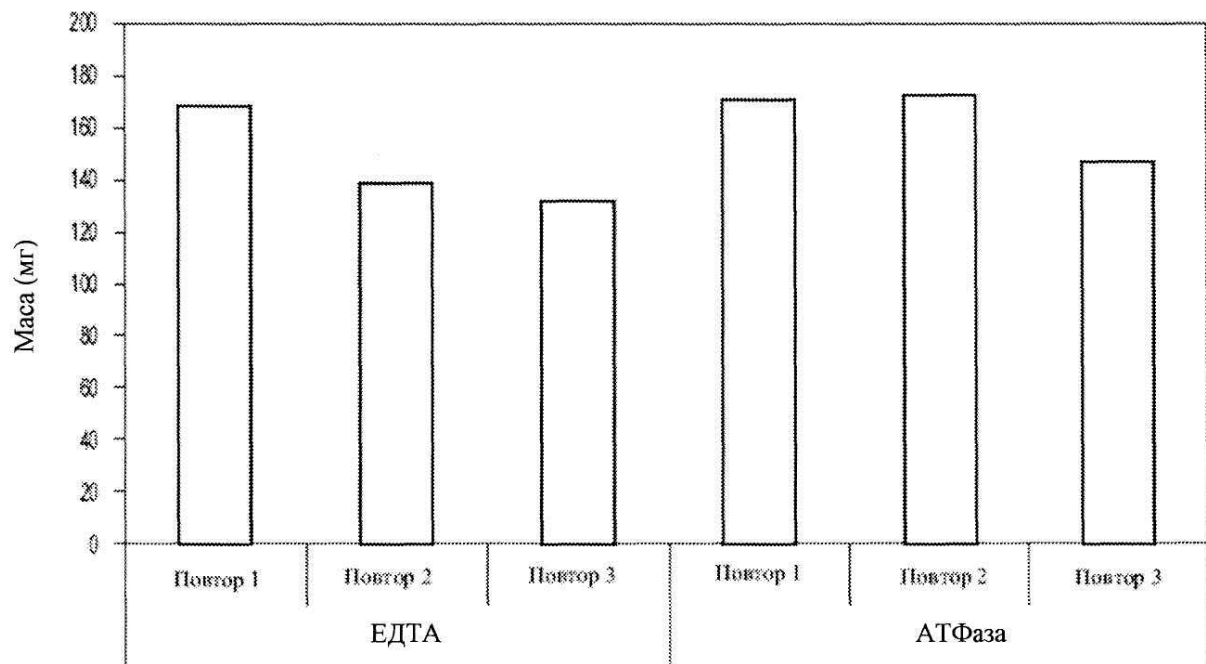
Фіг.22

Середнє збільшення маси *S. Littoralis* після 6 діб годування

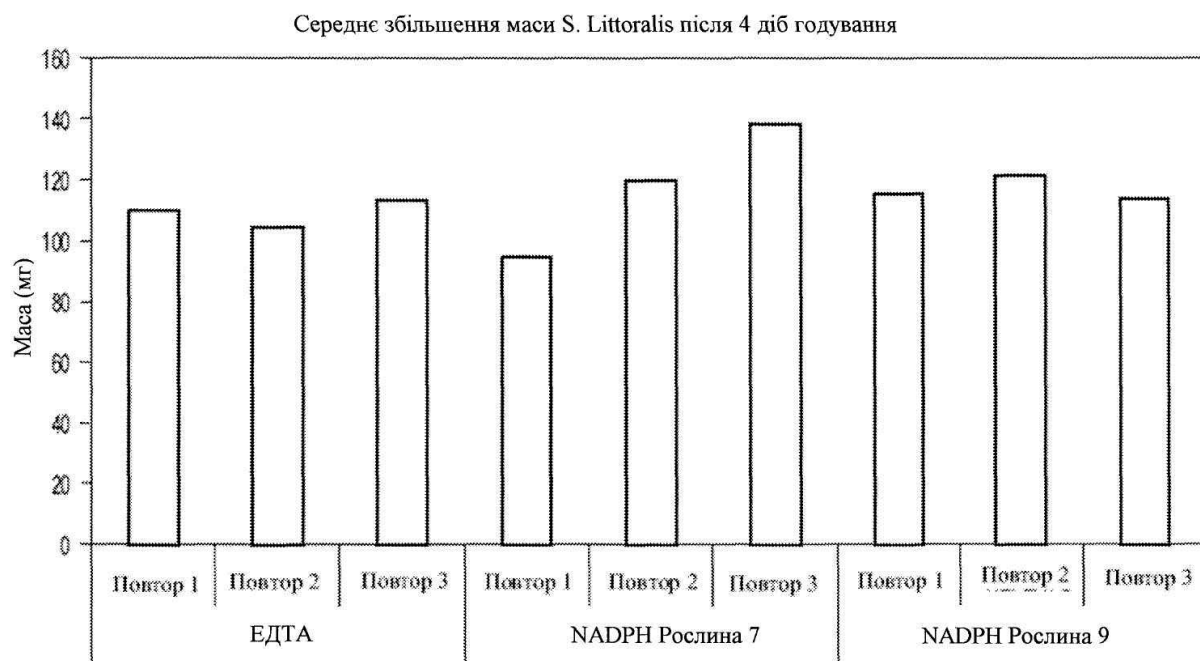


Фіг.23А

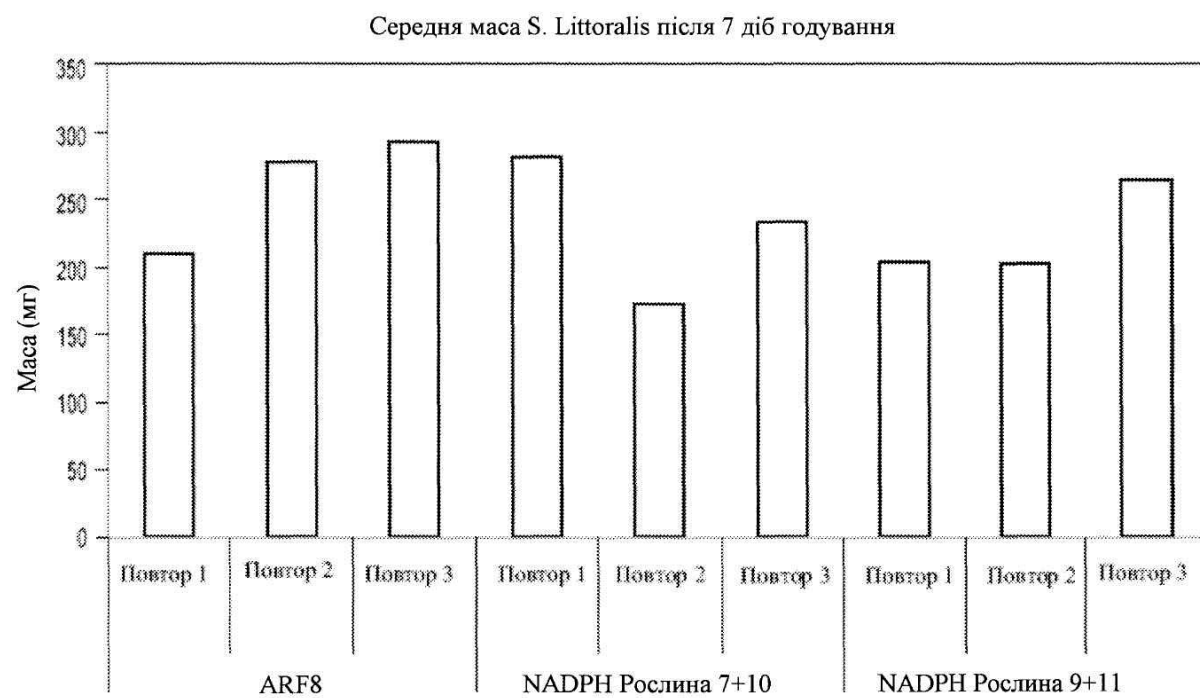
Середнє збільшення маси *S. Littoralis* після 5 діб годування



Фіг.23В

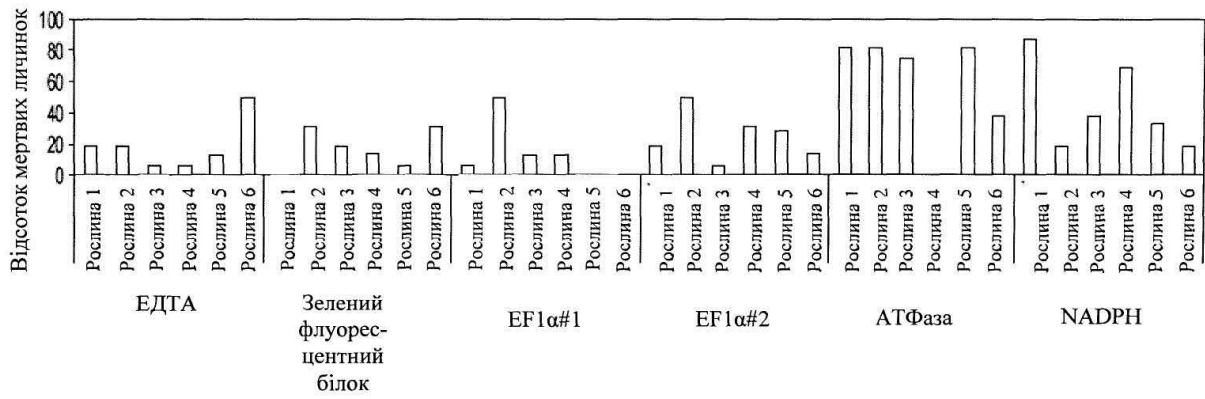


Фіг.24А



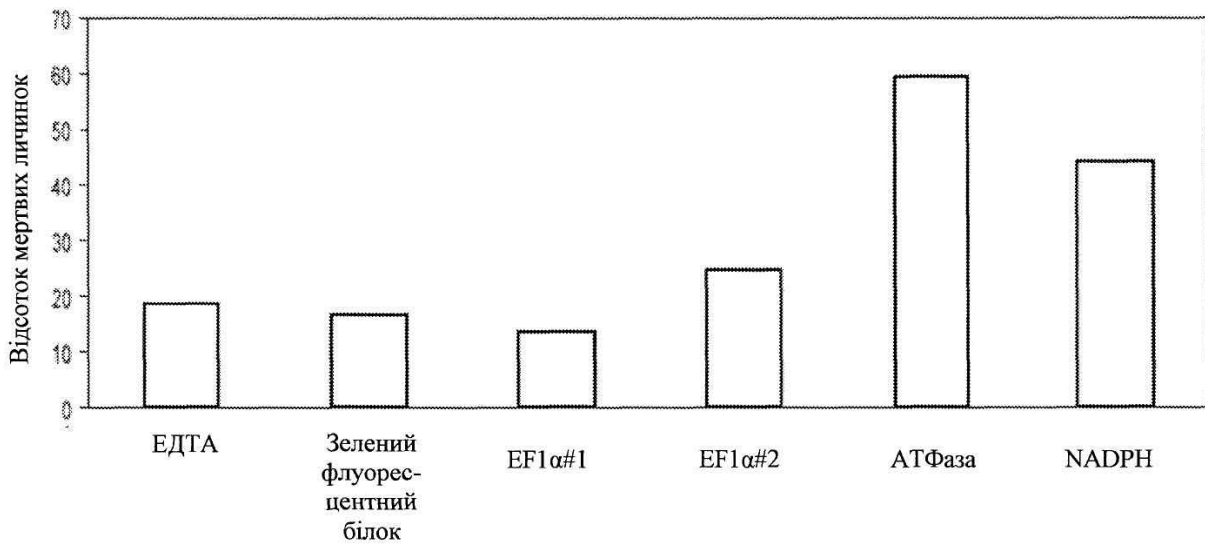
Фіг.24В

Відсоток метртивх личинок після годування обробленими рослинами протягом 8 діб



Фіг.25А

Відсоток метртивх личинок після годування обробленими рослинами протягом 8 діб



Фіг.25В

Відсоток мертвих личинок після годування обробленими рослинами

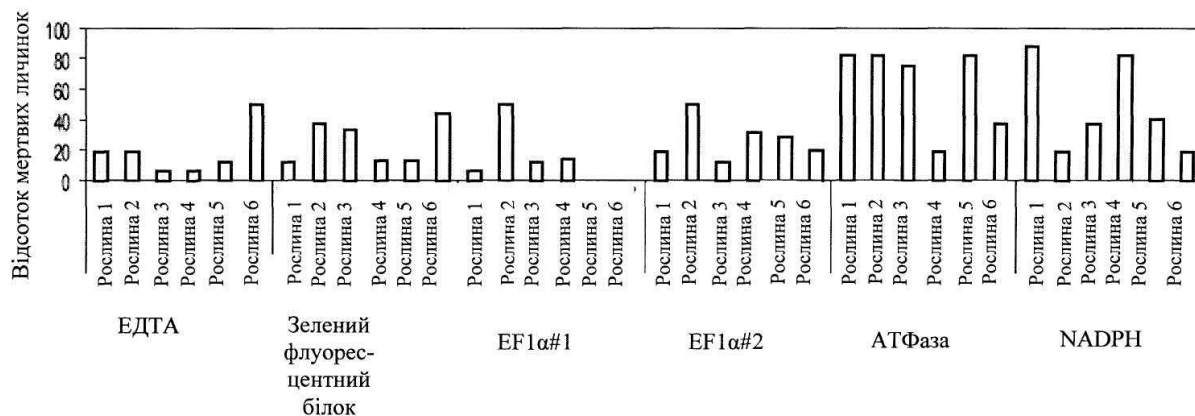


Fig.25C

Відсоток мертвих личинок після годування обробленими рослинами протягом 10 діб

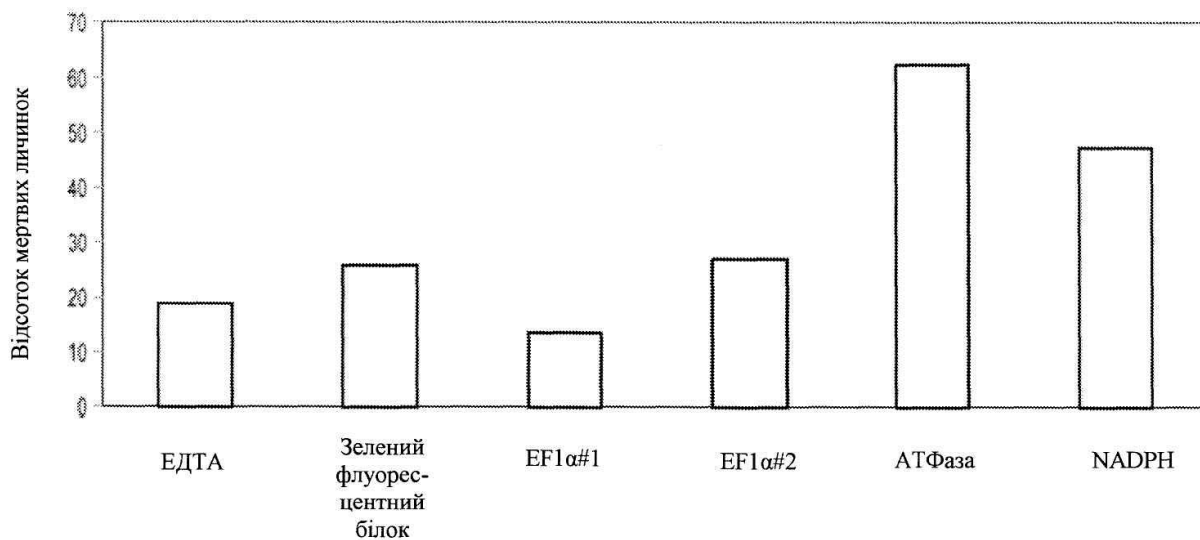


Fig.25D

Середня маса *S. Littoralis* на одну рослину після годування
обробленими рослинами протягом 8 та 9 діб

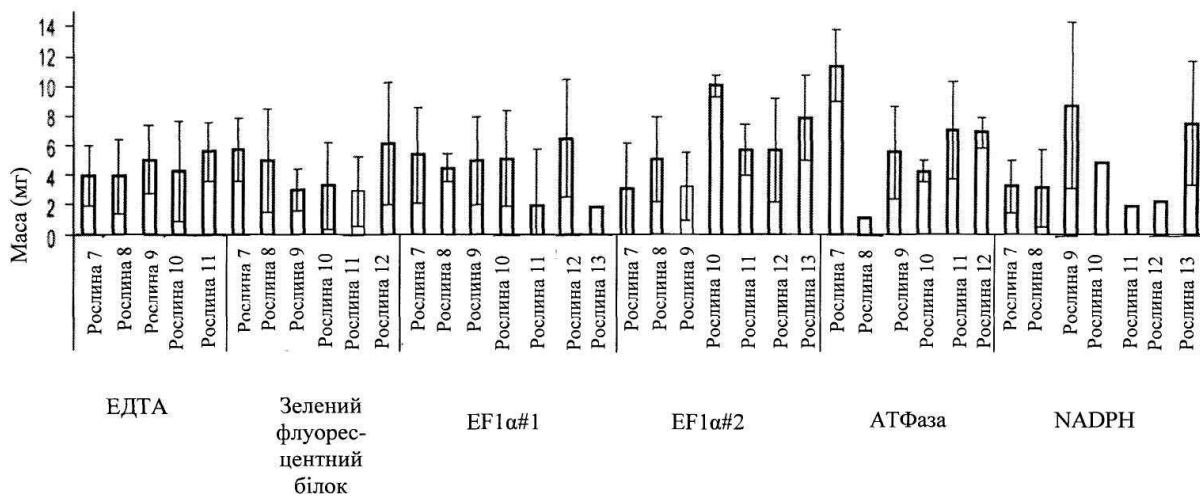


Fig. 25F

Середня маса *S. Littoralis* на одну рослину після годування
обробленими рослинами протягом 8 та 9 діб

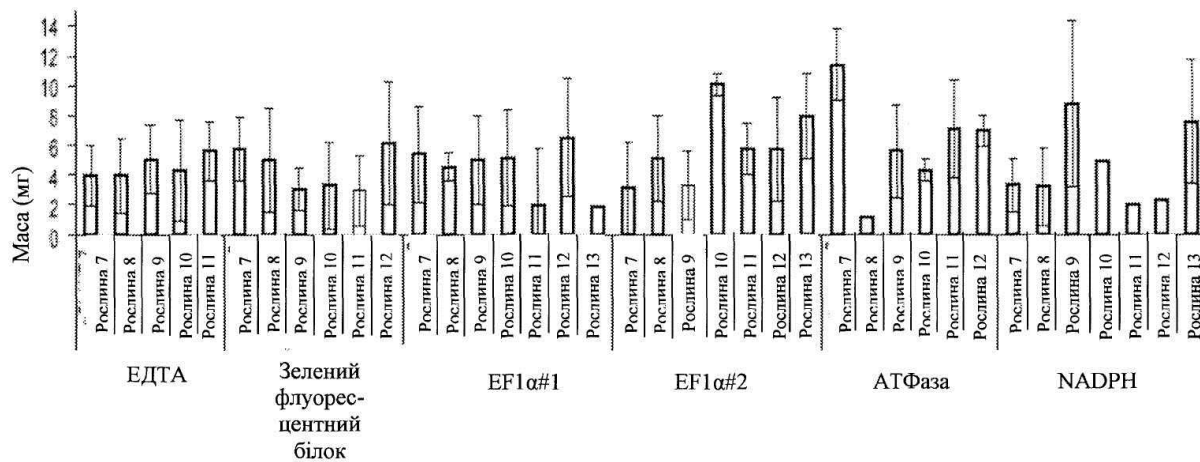
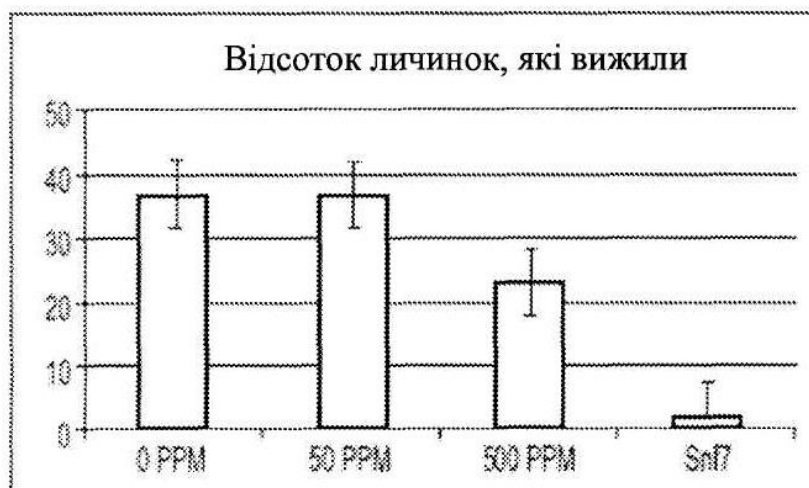
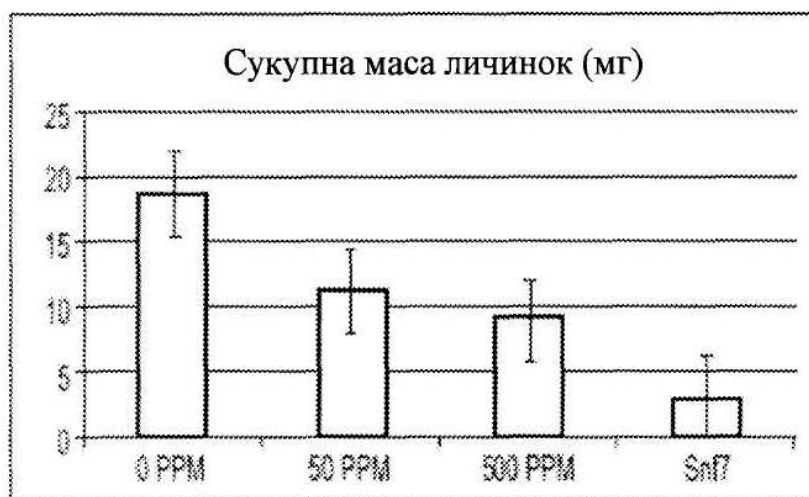


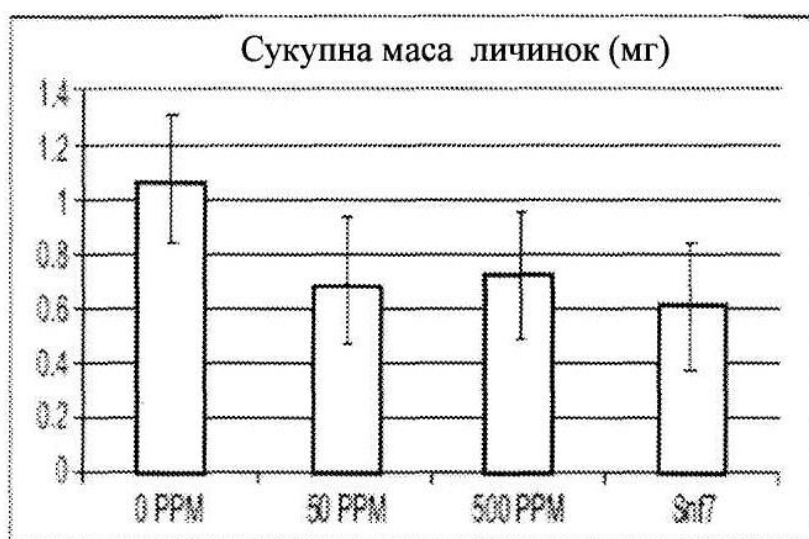
Fig. 25F



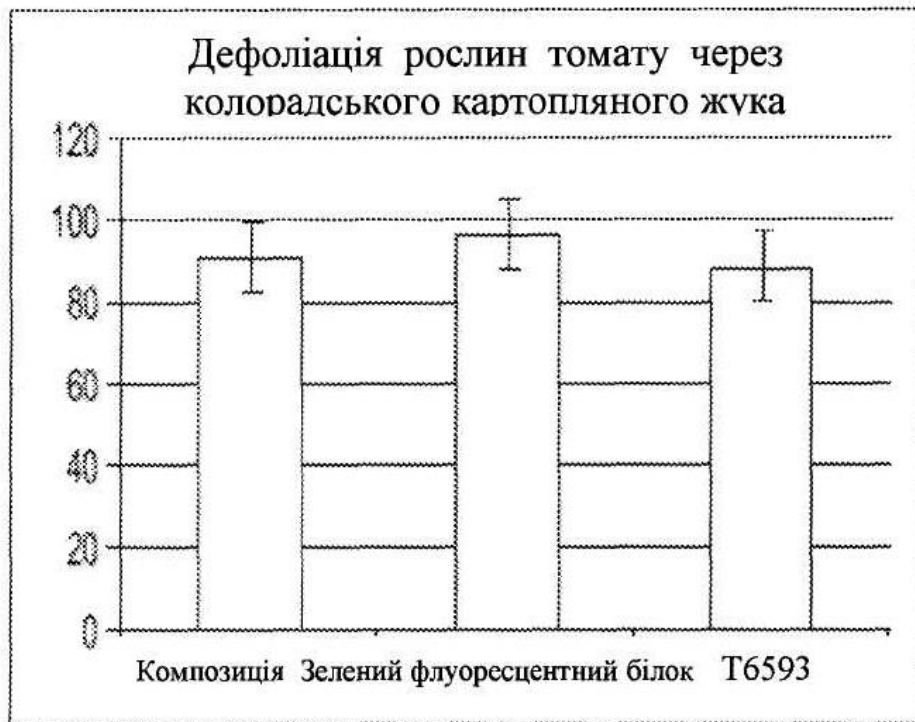
Фіг.26А



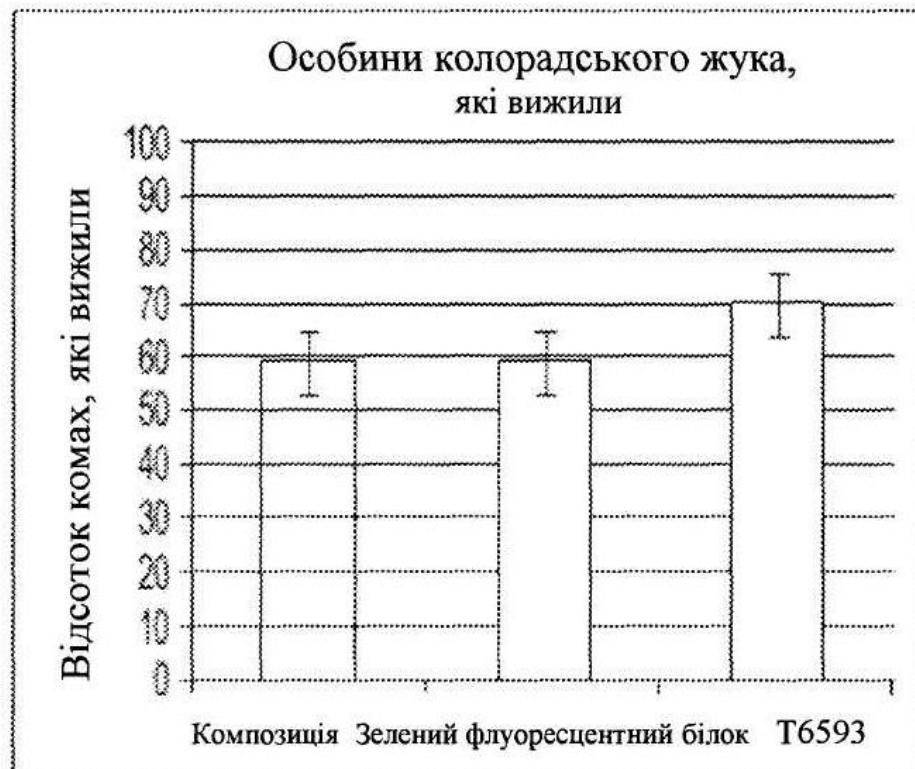
Фіг.26В



Фіг.26С



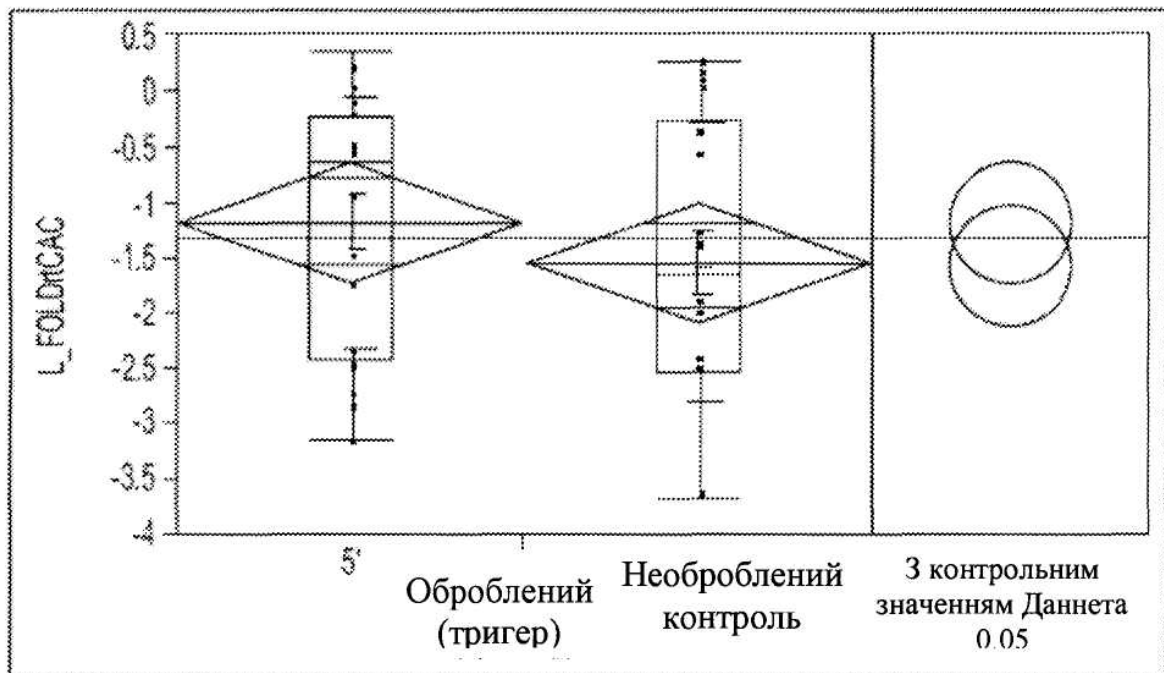
Фіг.27А



Фіг.27В



Фіг.27С



Фіг.28А

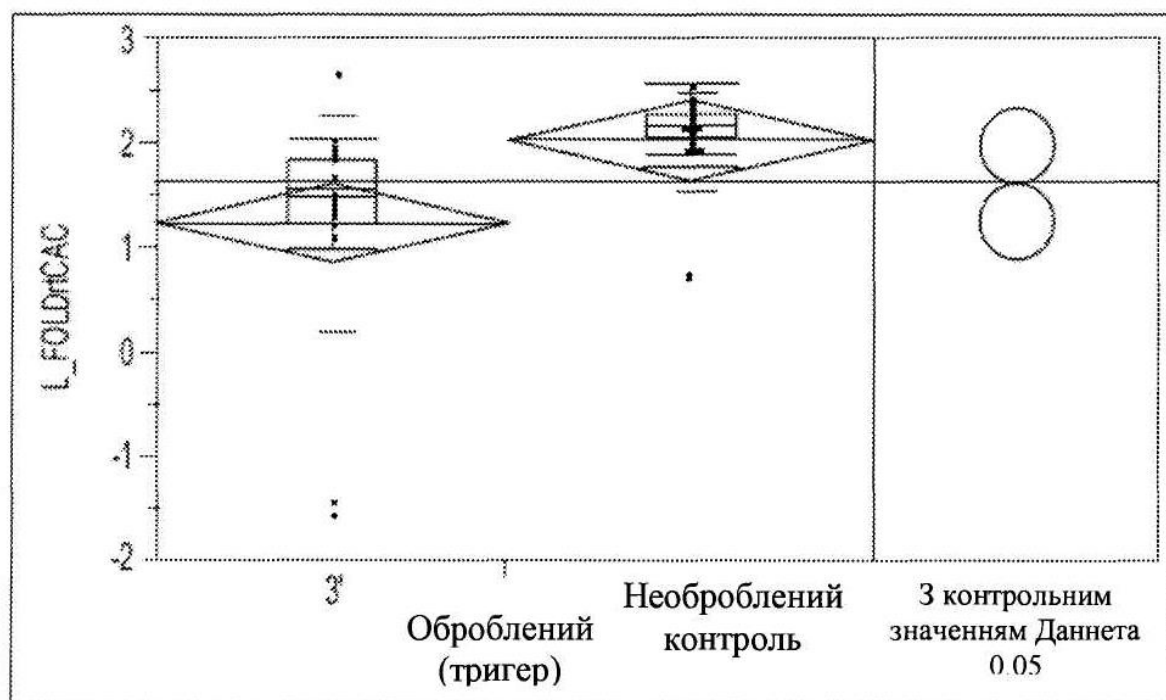


Fig.28B

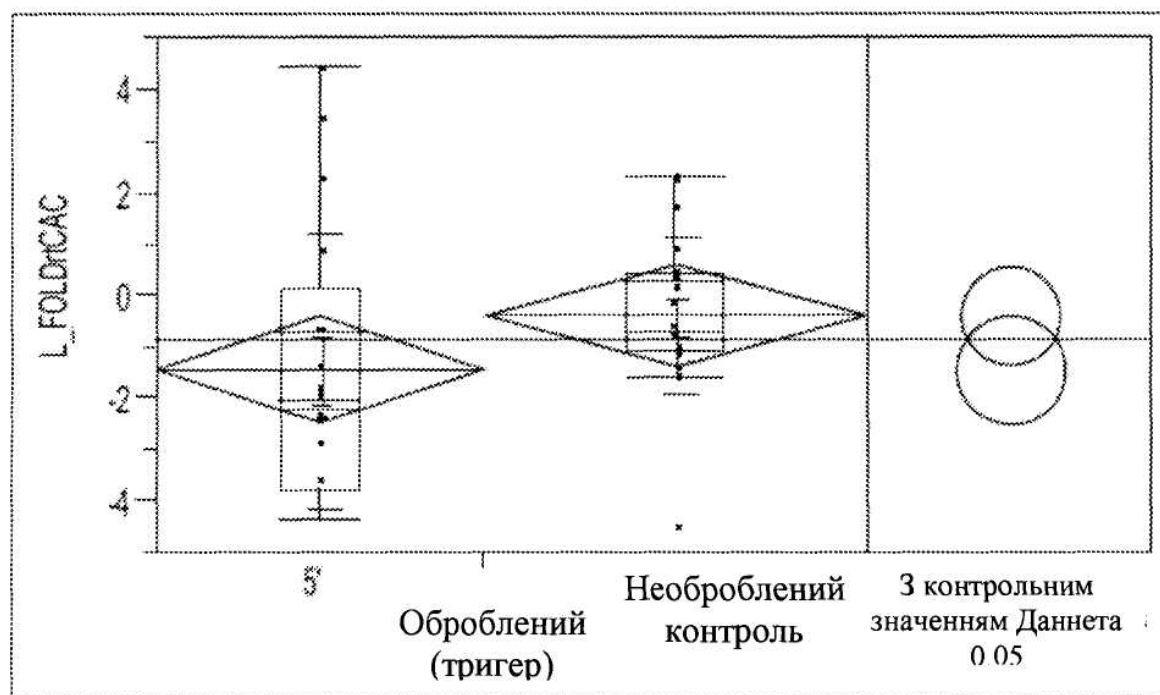
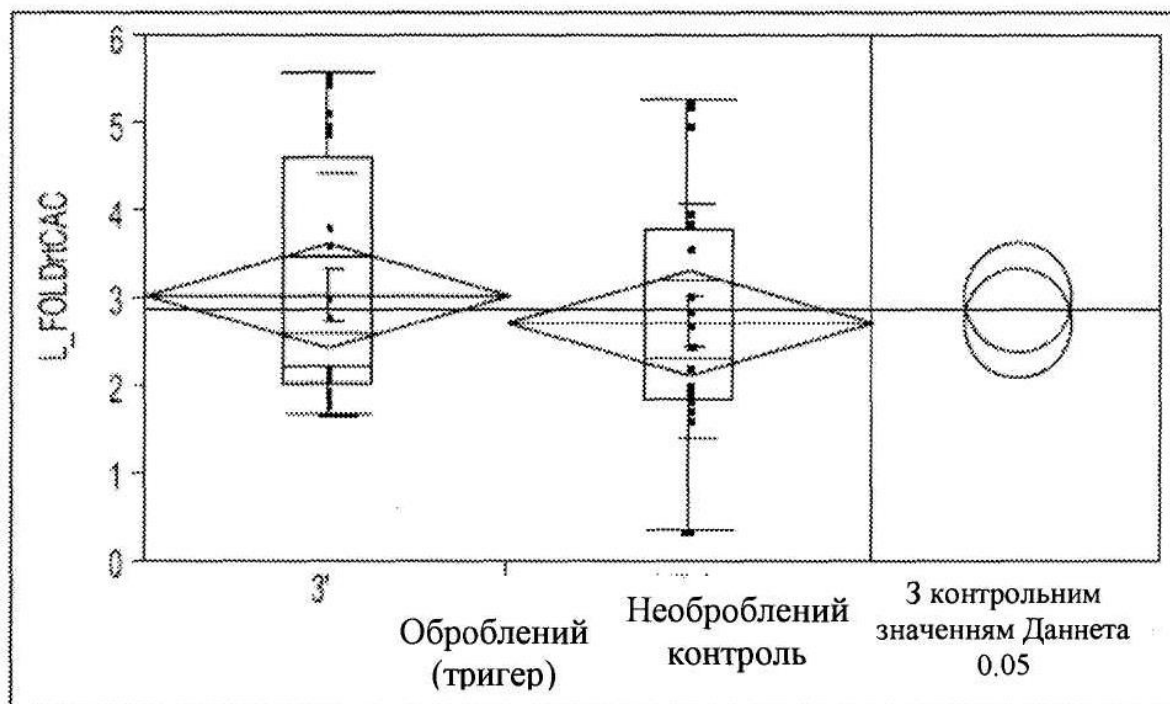
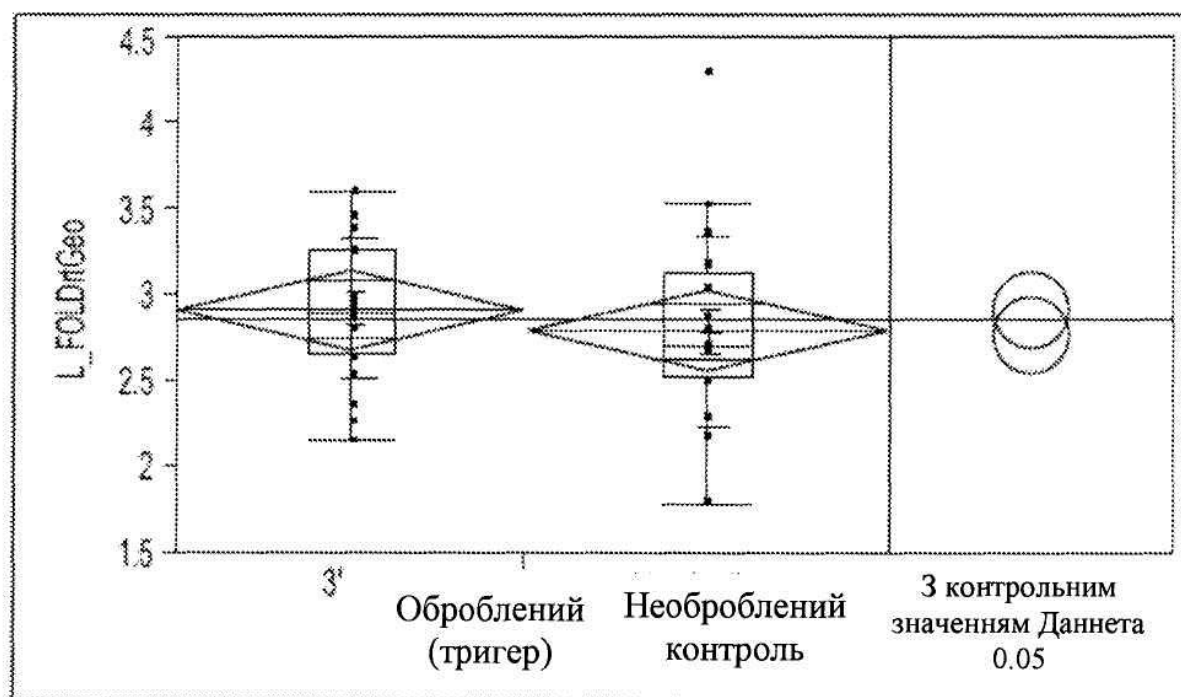


Fig.29A



Фиг.29В



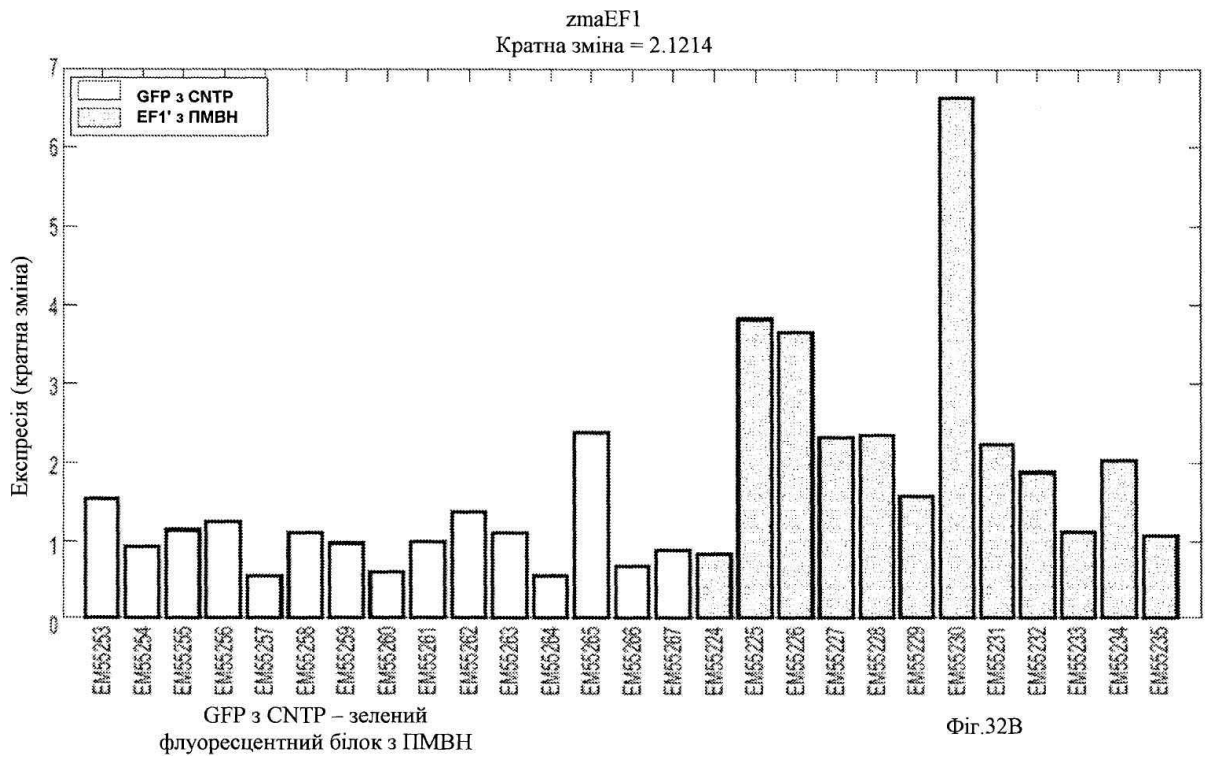
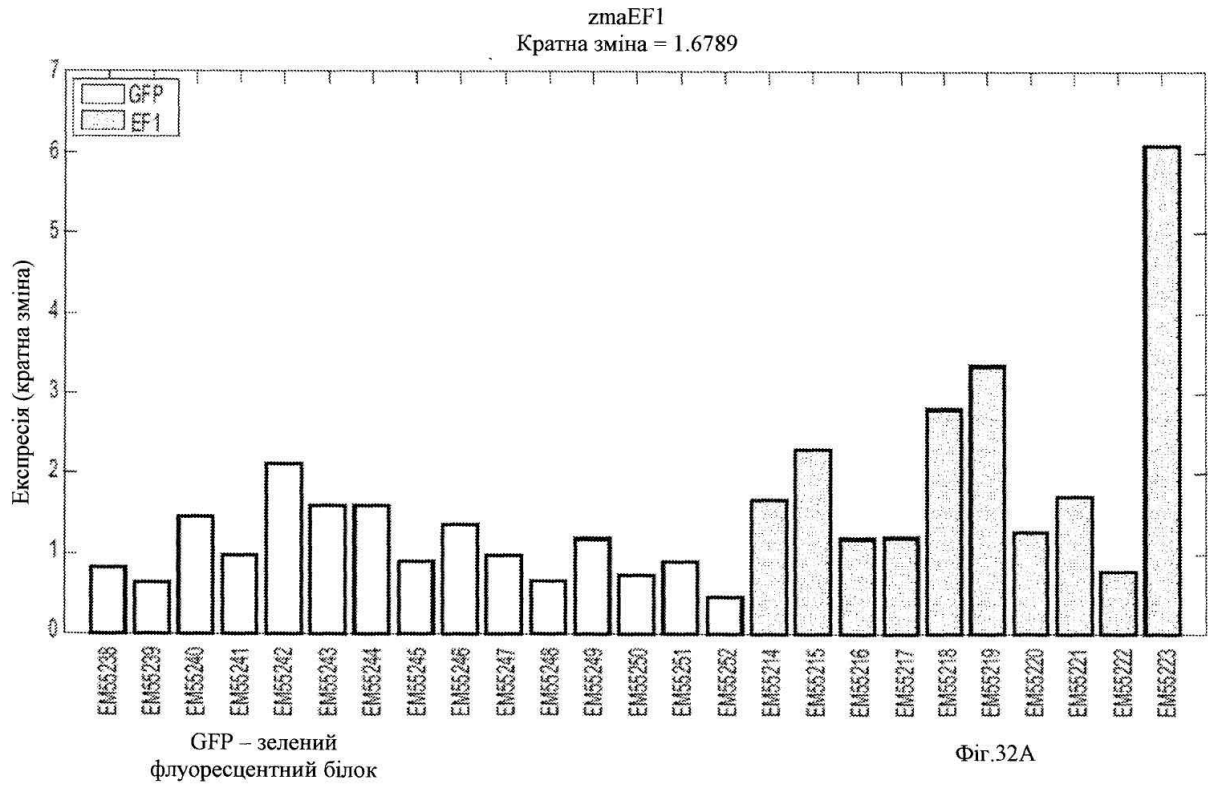
Фиг.30

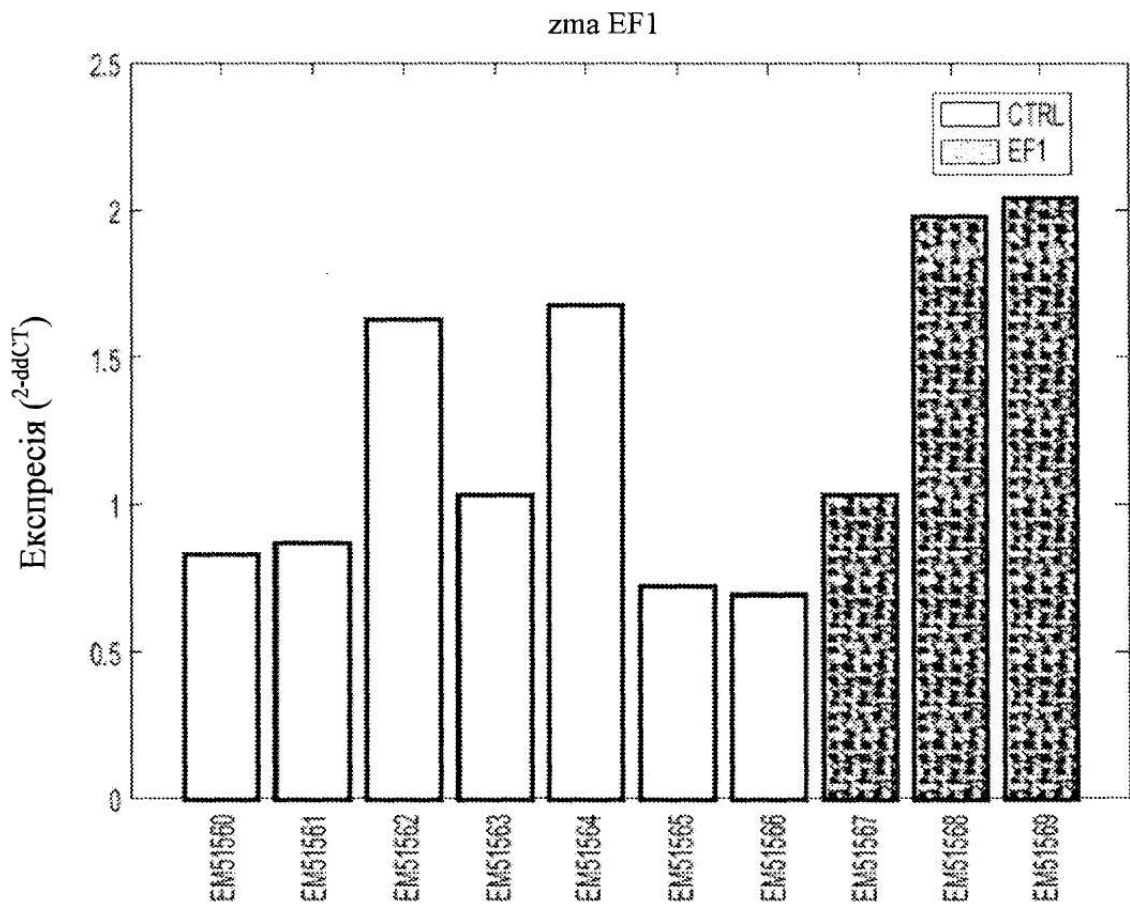
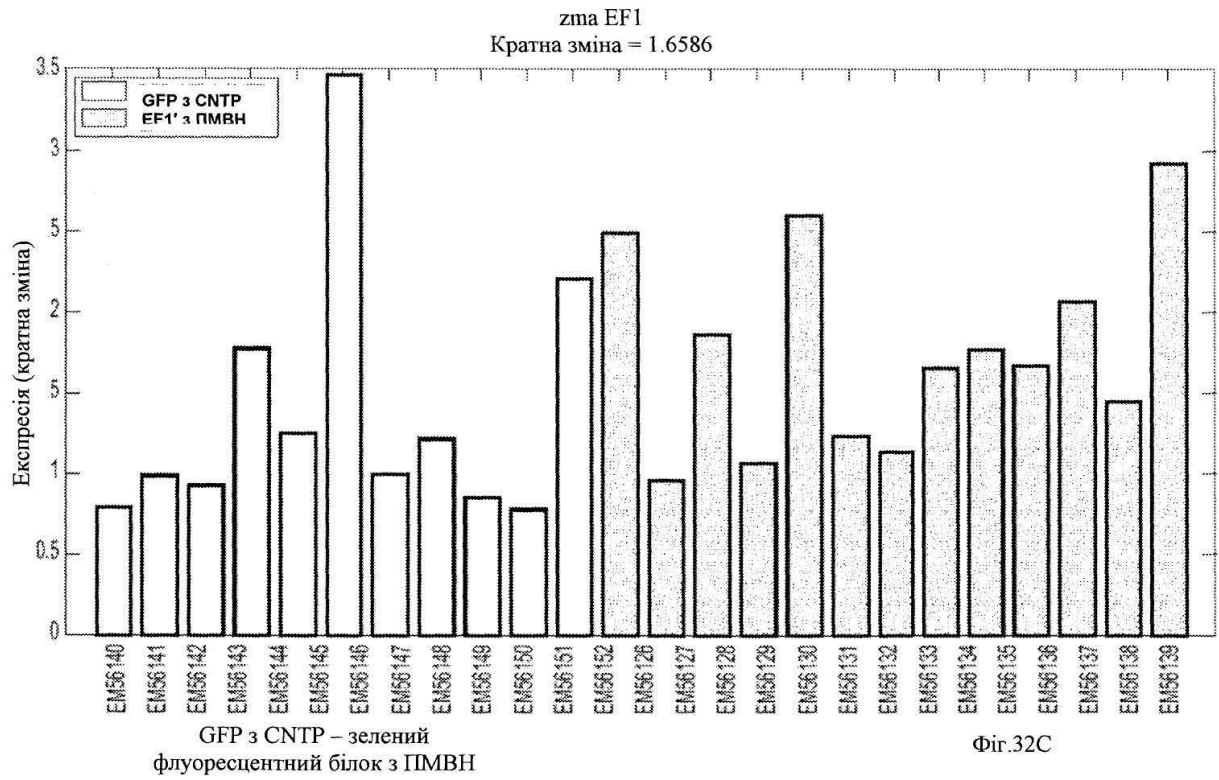
ОЦІНКА	ОЧІКУВАННЯ	ІДЕНТИЧНІСТЬ	ГЕПИ	ЛАНЦЮГ
284 BITS (282)	2e-69	238/400(75%)	0/400(0%)	ПЛЮС/ПЛЮС
QUERY 124	CCCACAGACAAGCCCCCTGGGTCTTCCCTCCAGGACGTATACAAAATCGGTGGTATTGGT	183		
SBJCT 837	CCCTGGGACAAGCCCCCTGGGTCTTCCCTCCAGGATGTGTACAAGATTGGTGGTATTGGA	896		
QUERY 184	ACGGTGCCCGTAGGCAGAGTTGAAACTGGTATCCTCAAGCCTGGTACCATCGTCTCTTC	243		
SBJCT 897	ACTGTGCCAGTTGGTCTGTGGAGACTGGTGTCTATCAAGCCTGGTATGGTTGTCACTTT	956		
QUERY 244	GCCCCCGCCAACATCACCCTGAAGTCAAGTCTGTGGAGATGCACCACGAAGCTCTCCAA	303		
SBJCT 957	GGTCCAAGTGGCCTGACTACTGAGGTGAAGTCTGTTGAGATGCACCATGAGGCTCTTCAG	1016		
QUERY 304	GAGGCGGTACCCCGTGACAAAGTTGGTTTCAACGTAAAGAACGTTTCCGTCAAGGAGTTG	363		
SBJCT 1017	GAGGCCCTTCCTGGTGACAATGTTGGCTTCAACGTGAAGAAGTCCGTGTGAAGGATATC	1076		
QUERY 364	CGTCGTGGTTACGTCGCTGGTGACTCCAGAACAAACCCACCCAGGGCGCCGCCGATTTC	423		
SBJCT 1077	AAGCGTGGTTATCTGGCCTCCAAGTCCWAGGATGACCCTGCCAAGGAGGCTGCCAGCTTC	1136		
QUERY 424	ACAGCACAGGTCATCGTGCTCAACCAACCTGGTCAAATCTCAAACGGATACACACCTGTG	483		
SBJCT 1137	ACCTCCAGGTCATCATCATGAACCAACCTGGGCAGATCGGTAAAGGTTATGCCCCAGTG	1196		
QUERY 484	CTGGATTGCCACACAGCCCACATTGCTGCAAGTTGCTG	523		
SBJCT 1197	CTGGACTGCCACACCTCCCATATTGCTGTCAAGTTTGCTG	1236		

Фиг.31А

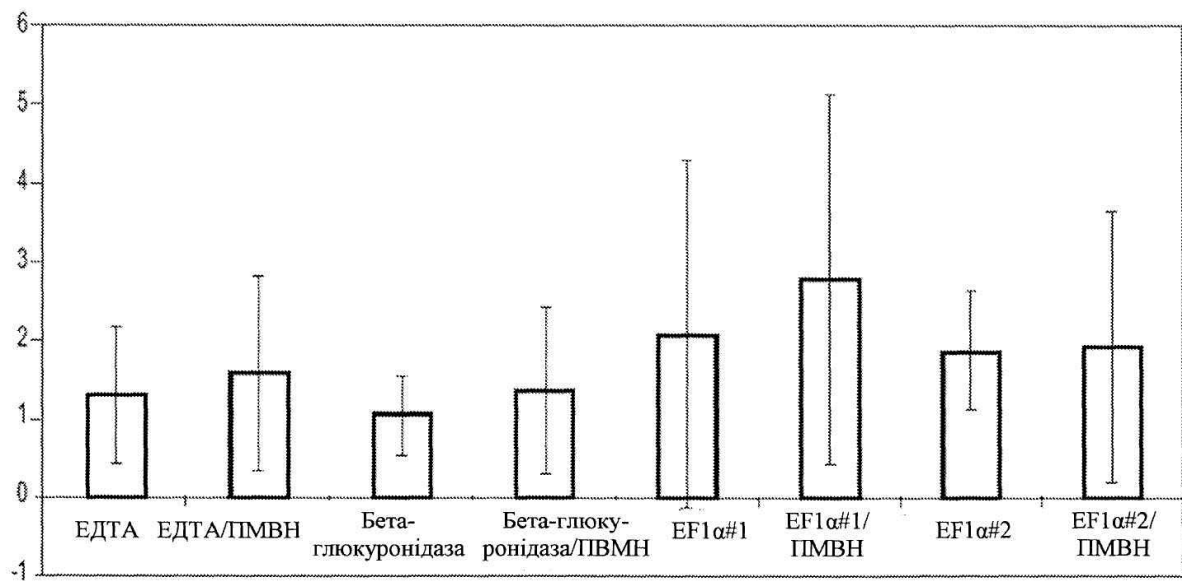
ОЦІНКА	ОЧІКУВАННЯ	ІДЕНТИЧНІСТЬ	ГЕПИ	ЛАНЦЮГ
300 BITS (332)	2n-30	335/446(75%)	9/445(1%)	ПЛЮС/ПЛЮС
QUERY 32	GAAATGGCTAAGGGTTCCTTCAAATACGCTGGGTATTGGACAAACTGAAGGCTGAGCGT	91		
SBJCT 218	GAAATGAATAAGCGGTCCTTCAAGTACGCTGGGTGCTCGACAAGCTCAAGGCTGAGCGT	277		
QUERY 92	GAACGTGGTATCACCATTGATATTGCTCTGTGGAAGTTCGAAACCGCTAAATACTATGTC	151		
SBJCT 278	GAGAGAGGTATCACCATTGATATTGCTCTGTGGAAGTTTGAGACCACCAAGTACTACTGC	337		
QUERY 152	ACCATTATTGACGCTCCCGGACACAGAGATTTATCAAGAACATGATCACTGGAAOCTCC	211		
SBJCT 338	ACGGTCATTGATGCCCTGGACACCGTGACTTCATCAAGAACATGATCACTGGTAOCTCC	397		
QUERY 212	CAGGCCGATTGCGCCGTAC---TCATTGTGCGCCGCTGGTACCGGTGAATTCCAGGCTGGT	268		
SBJCT 398	CAGGCTGACTGTGCTGTCTTATCATTGACTCCAC---CACTGGTGGTTTGGAGGCTGGT	454		
QUERY 269	ATCTCGAAGAACGGACAGACCCGTGAGCACGCTCTGCTCGCTTTCACACTCGGTGTCAAG	328		
SBJCT 455	ATCTCCAAGGATGGCCAGACCCGTGAACATGCTCTCCTTGOGTTCAOCTTGGAGTGAAG	514		
QUERY 329	CAGCTGATTGTGGGCGTCAACAAATGGACTCCACTGAGCCCCCATACAGCGAATOCCGT	388		
SBJCT 515	CAGATGATTTGCTGCTGCAACAAGATGGATGCAACCACTCCCAATACTCCAAGGCACGT	574		
QUERY 389	TTGAGGAAATCAAGAAGGAAGTGTCCTCTACATCAAGAAGATCGGTTACAAOCCAGCT	448		
SBJCT 575	TATGAAGAGATTGTGAAGGAAGTCTCATCTACCTCAAGAAAGTTGGGTACAAOCCGTGAT	634		
QUERY 449	GCTGTCGCTTTCGTACCCATTTCTGG	474		
SBJCT 635	AAGATTGCCTTTGTTCCCATTTCTGG	650		

Фір.31B

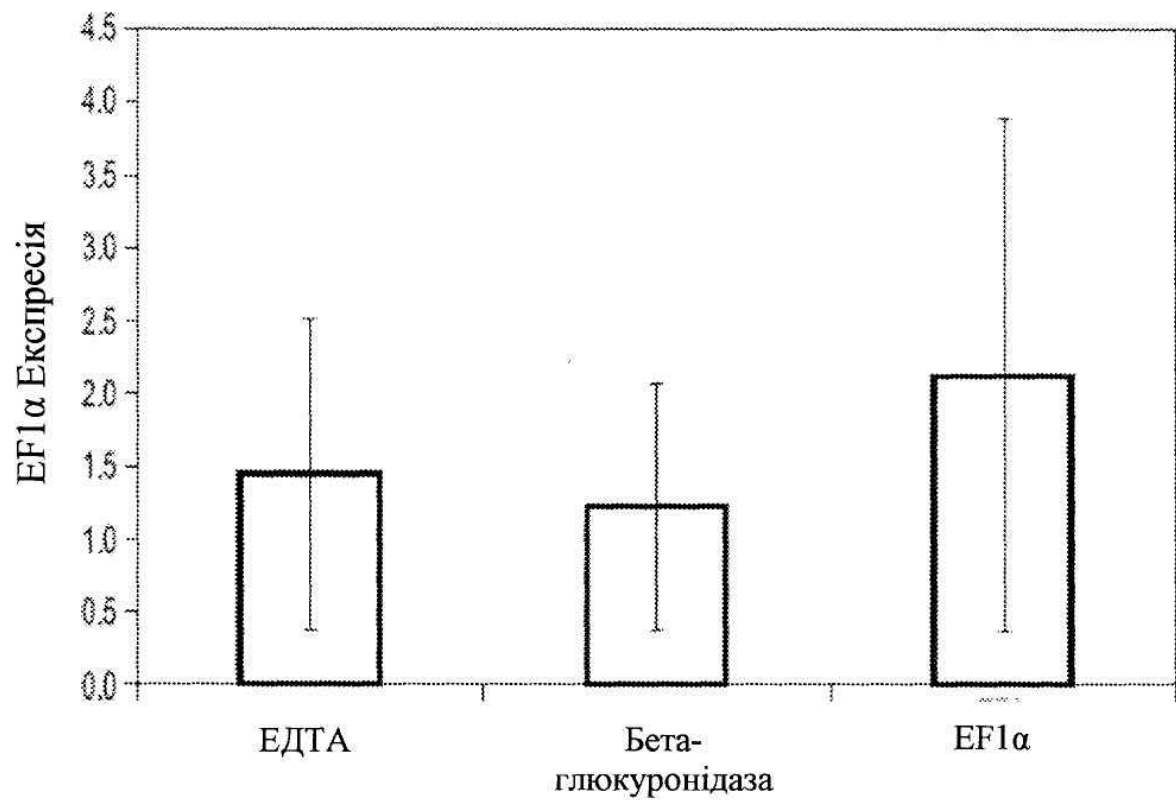




Фір.33



Фіг.34А



Фіг.34В

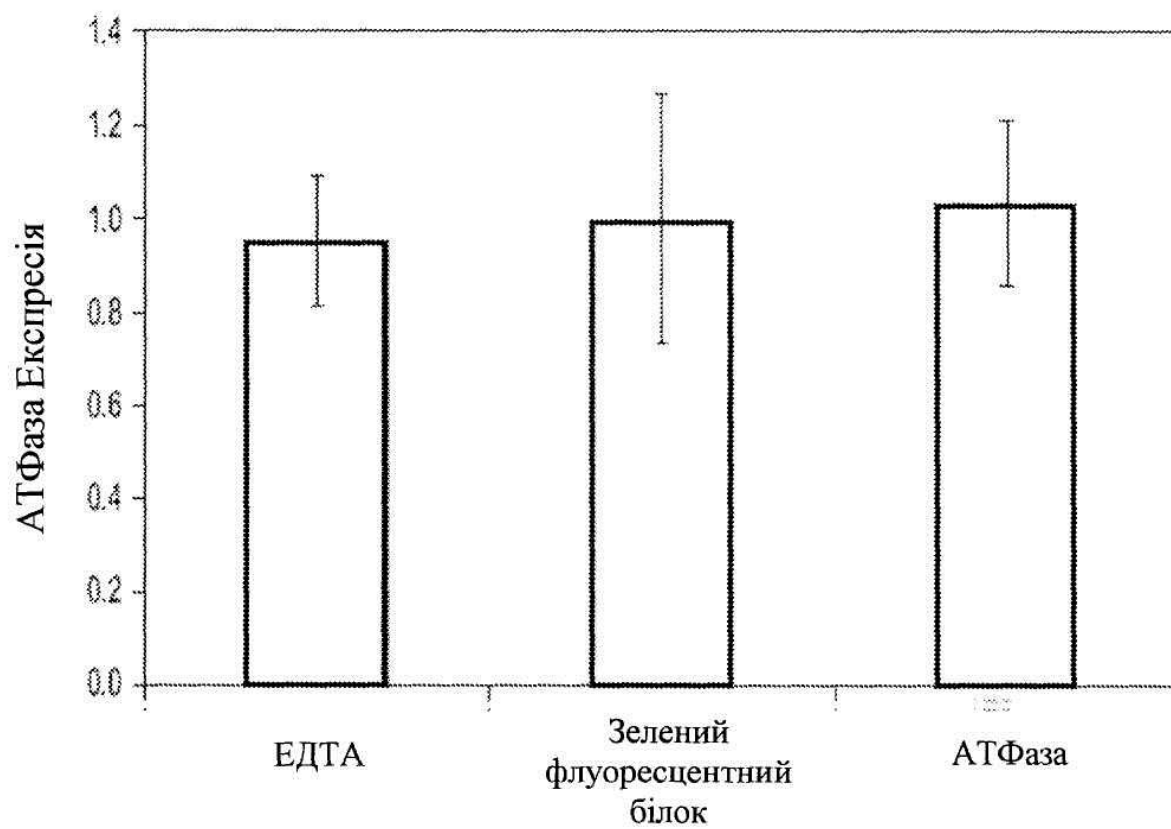


Fig.35A

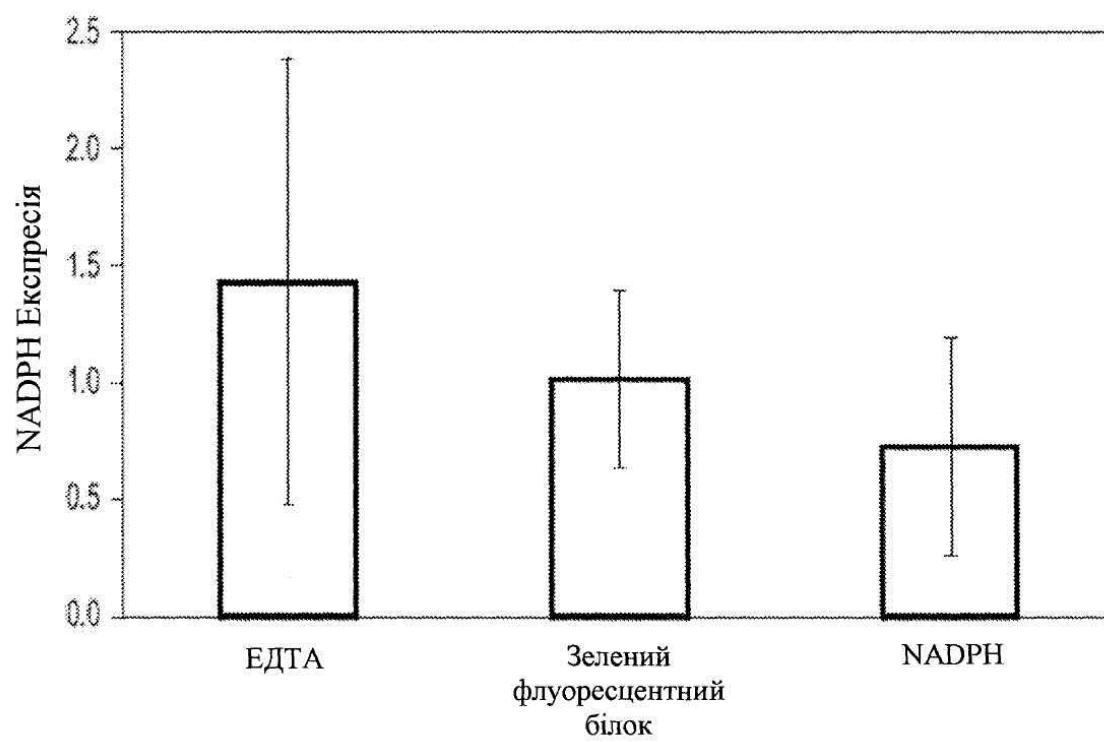


Fig.35B

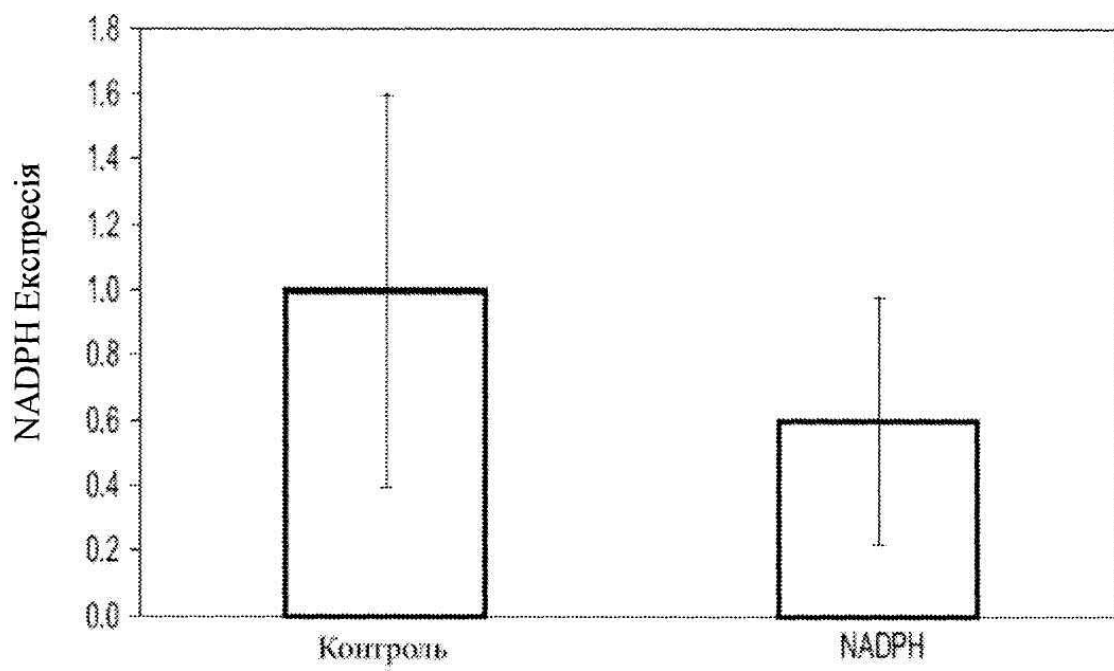


Fig.35C